

Estudio de protocolos de comunicación bacterianos: conjugación y quorum sensing.



Diego Pardilla Mata

Laboratorio de Inteligencia Artificial.

Universidad Politécnica de Madrid.

Tesis presentada para obtener el título de

Máster

2011 Febrero

1. Director: Alfonso Rodríguez Patón

Día de la defensa: 11 de Febrero de 2011

Firma del presidente/a del tribunal de la tesis:

Dedicatoria:

A Mónica y Alfonso por regalarme su tiempo.

Resumen

Los conjuntos bacterianos son sistemas dinámicos complejos, y gracias a la interacción que hay, las bacterias coexisten, colaboran, compiten e intercambiando información. El resultado de estas interconexiones hace que surjan propiedades que no pueden explicarse a partir de una sola célula aislada. Estos comportamientos se denominan propiedades emergentes del sistema. Algunas de las maneras que tienen de interactuar las bacterias son la detección de quórum ¹ o quorum sensing y la conjugación. El quorum sensing es un mecanismo que permite a las bacterias difundir una señal sobre el medio en el que se encuentran, y así modificar su comportamiento en función de la concentración que existe de esta señal. La conjugación es un tipo de operación que realizan las bacterias para intercambiarse material genético.

Las colonias de bacterias se encuentran en todos los ámbitos de la naturaleza. Desde el suelo, hasta el sistema digestivo de un animal. Hasta hace pocos años se creía que las bacterias no poseían habilidades sociales y que no se comunicaban con sus congéneres. Sin embargo, actualmente se conocen diferentes mecanismos de comunicación e interacción entre las bacterias, como por ejemplo, el quorum sensing y la conjugación. Las bacterias, toman decisiones por mayoría (quorum sensing) y se intercambian información importante, como por ejemplo, la resistencia a un antibiótico, mediante la denominada conjugación (transmisión de una hebra de ADN circular denominada plásmido).

El conocimiento actual de los biólogos sobre estos protocolos de comunicación es muy preciso, de manera que se pueden programar de manera artificial bacterias sintéticas, para que reciban y emitan las “señales” biológicas

¹A partir de ahora se utilizará la terminología más usual en la literatura científica, *quorum sensing*.

que nosotros deseemos. Es decir, el quorum sensing y la conjugación son actualmente dos herramientas que se pueden utilizar para programar bacterias sintéticas.

Los modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias, permiten representar la difusión de un sistema homogéneo en donde todo se encuentra bien mezclado. Si además de la evolución del sistema se quiere tener en cuenta la disposición espacial se necesitarán herramientas más sofisticadas como son las ecuaciones diferenciales parciales. El cálculo de ecuaciones diferenciales parciales es muy costoso computacionalmente, con lo que se usan otras herramientas, como son los autómatas celulares, cuyo coste computacional es menor. Los autómatas celulares pueden ser determinísticos o estocásticos dependiendo de sus interacciones locales, además de continuos o discretos según el tratamiento que se le dé al espacio.

El planteamiento de esta tesis es el siguiente:

1. Definición e historia del quorum sensing y la conjugación.
2. Presentación de algunos experimentos reales sobre la conjugación.
3. Exposición de algunos modelos matemáticos de sistemas complejos bacterianos con conjugación.
4. Conclusión y futuro trabajo de investigación.

Los objetivos del documento son: estudiar y comprender los protocolos de comunicación en las colonias bacterianas, exponer ejemplos reales sobre el uso de la conjugación, y, dependiendo de las necesidades del observador, crear distintos modelos matemáticos o computacionales que simulen el mecanismo de la conjugación.

En biología de sistemas, es importante conocer cómo se comunican las bacterias para desarrollar futuros antibióticos que puedan atacar e interferir en los procesos de comunicación inter-bacterianos. En biología sintética, es valioso conocer los distintos protocolos de comunicación que existen, para poder diseñar circuitos genéticos a nivel de población. Circuitos distribuidos en una población de bacterias. Cada bacteria puede tener una parte del circuito global que está disperso entre toda la población. Es decir, tenemos un

ordenador paralelo (cada bacteria es un procesador) en el que cada bacteria puede realizar un cálculo diferente con entradas distintas. Las bacterias se comunican para realizar cálculos globales. Arquitectura MIMD (Múltiple instrucción, múltiple dato).

El proyecto europeo del Séptimo Programa Marco denominado BACTO-COM en el que participa el LIA y a partir del cual surge esta tesis de Máster, pretende utilizar el hardware de la conjugación bacteriana para programar poblaciones de bacterias, de manera que, analicen y evalúen en paralelo circuitos genéticos sintéticos. De esta manera, la población de bacterias, se puede considerar, como un ordenador paralelo que recibe datos que son procesados a la vez y de manera distribuida. La forma de transmitir la información entre las bacterias es mediante la conjugación. Las piezas de información o datos que se transmiten, están codificados en hebras de ADN circulares, denominadas plásmidos. La forma de procesar información, es análoga a la que se realiza en un algoritmo genético. Pero ahora no se simula el proceso evolutivo. Ahora la evaluación y la evolución de las soluciones candidatas son reales y se procesan “in vivo” dentro de bacterias, y no “in silico” como en los algoritmos genéticos. No obstante, BACTO-COM también contempla la simulación in silico de dicho proceso evolutivo bacteriano.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| Índice de figuras | VII |
| Índice de Tablas | IX |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Antecedentes y motivación | 1 |
| 1.2. Estructura del documento | 4 |
| 2. Estado de la cuestión | 7 |
| 2.1. Comunicación entre bacterias | 7 |
| 2.1.1. Introducción | 7 |
| 2.1.2. Conjugación | 8 |
| 2.1.3. Quorum sensing | 20 |
| 2.2. Circuitos con comunidades de bacterias | 27 |
| 2.2.1. Introducción | 27 |
| 2.2.2. Conjugación bacteriana | 27 |
| 2.3. Modelos para simular un sistema bacteriano | 39 |
| 2.3.1. Introducción | 39 |
| 2.3.2. Clasificación de los distintos modelos según la continuidad de sus variables | 39 |
| 2.3.3. Modelo clásico de crecimiento exponencial | 40 |
| 2.3.4. “Interactive Particules Systems” o IPS | 43 |
| 2.3.5. Modelo con ecuaciones diferenciales ordinarias o ODE | 55 |
| 3. Conclusiones y futuras líneas de investigación | 61 |
| 3.1. Conclusión y futuras líneas de investigación | 61 |

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--------------|----|
| Glosario | 63 |
| Bibliografía | 67 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| 2.1. Material genético | 8 |
| 2.2. Conjugación bacteriana | 9 |
| 2.3. Experimento de Lederberg y Tatum | 12 |
| 2.4. Experimento de Davis | 15 |
| 2.5. Cigoto | 15 |
| 2.6. Experimento de Hayes | 17 |
| 2.7. Maquinaria de conjugación | 18 |
| 2.8. Quorum sensing | 21 |
| 2.9. Quorum sensing en bacterias gram-negativas | 24 |
| 2.10. N-acyl homoserine lactone | 26 |
| 2.11. Autoinductor-2 | 26 |
| 2.12. Interacción de los riboreguladores | 29 |
| 2.13. Proceso de conjugación | 30 |
| 2.14. Esquema de bacteria | 32 |
| 2.15. Diseño puerta NAND | 33 |
| 2.16. Nodo de la red | 34 |
| 2.17. Esquema de la red de bacterias | 35 |
| 2.18. Gráfico de g_r con respecto al tiempo: | 43 |
| 2.19. Gráfico de λ con respecto al tiempo: | 44 |
| 2.20. Gráfico de eficiencia conjugativa 1: | 44 |
| 2.21. Gráfico de eficiencia conjugativa 2: | 45 |
| 2.22. Estructura de la malla para el modelo IPS | 47 |
| 2.23. Ejemplo de la función $\psi(C)$ | 48 |
| 2.24. Interpretación en gráficas de las tasas, k_- y k_+ : | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| 2.1. Grupos de incompatibilidad | 11 |
| 2.2. Modelos matemáticos | 41 |
| 2.3. Parámetros del modelo | 54 |
| 2.4. Parámetros del EDO | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

1

Introducción

1.1. Antecedentes y motivación

La biología sintética es una disciplina que pretende diseñar y construir nuevos dispositivos y organismos biológicos artificiales, así como, rediseñar y reprogramar los sistemas biológicos naturales.

Los objetivos de la biología sintética son: hacer diseños biológicos más eficientes, eficaces, escalables, transparentes y seguros. Aunque actualmente se usa en la producción química, la biología sintética está encaminada a resolver un amplio abanico de problemas, como son materiales programables, organismos terapéuticos y sistemas con soportes agrícolas y medioambientales.

Es un campo emergente, únicamente lleva alrededor de diez años investigándose.

Se divide en dos grandes familias. Una, utiliza las moléculas artificiales para reproducir comportamientos emergentes de la biología natural, con el objetivo de crear vida artificial. Y la otra, utiliza piezas de la biología natural para montar sistemas con comportamientos artificiales. En cualquiera de los casos, lo sintético conduce a los científicos a cruzar un terreno desconocido para encontrar y resolver problemas cuya respuesta no se encuentra fácilmente a través del análisis. Esto conlleva la aparición de nuevos paradigmas cuyo estudio no es sencillo.

Existen cuatro ramas de investigación, que representan las diferentes aproximaciones que toman los investigadores dependiendo de su área de procedencia: biología, química, ingeniería e informática.

1. INTRODUCCIÓN

En 1978, el Premio Nobel de Medicina fue para Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton O. Smith, por el descubrimiento de las enzimas de restricción. Este descubrimiento marcó el inicio de la tecnología del ADN recombinante y la ingeniería genética. A partir de ese hallazgo, los investigadores tenían la posibilidad de modificar los genomas de los organismos, cortando y pegando segmentos de su ADN. Durante años, los ingenieros genéticos han hecho ligeras modificaciones en el genoma de los organismos, ya sea mediante la inserción o supresión de uno o dos genes, con el fin de observar los cambios fenotípicos. Más recientemente, como el conocimiento de los sistemas biológicos ha crecido, la biología sintética ha empezado a robar la atención de muchos científicos. Este campo se basa en los principios de la ingeniería genética, pero intenta modificar el genoma en una escala mucho mayor. En lugar de insertar o eliminar uno o dos genes, los biólogos sintéticos usan el ADN recombinante y la síntesis de ADN artificial para introducir redes enteras de genes en organismos. Debido a su compleja naturaleza, la biología sintética se nutre de diferentes disciplinas como son la biología, las matemáticas, la ingeniería y la química. Los modelos matemáticos mejoran el diseño de los sistemas sintéticos antes de su aplicación en el laboratorio. Las posibles áreas de influencia de tales dispositivos biológicos son muy amplias, van desde la producción de biocombustibles reutilizables, hasta el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el objetivo de la biología sintética no es sólo construir nuevos sistemas biológicos, sino también comprender los que ya existen.

Adleman [1] fue pionero en utilizar la biología como método para computar. Explicó como resolver el problema del camino Hamiltoniano, simplemente, con el uso de hebras de ADN. Este dilema es de gran interés dado que su coste computacional es NP-Completo. Fue entonces, cuando el mundo científico se dio cuenta del gran potencial que este campo abarcaba. Este tipo de computación parece que permitirá explorar fronteras que con simples operaciones algebraicas no se pueden llegar.

Trabajos como el “repressilator” de Elowitz y Leibler [2], que fue uno de los primeros resultados prácticos de la biología sintética. Explica cómo conseguir un oscilador artificial, mediante una red de regulación génica en una *escherichia coli* ¹.

Drew Endy [3] ha aplicado con éxito a ciertos sistemas biológicos, como el bacteriófago T7, una técnica informática conocida como remanufactura. La idea consiste en reescribir el ADN del ser bajo estudio, eliminando el ADN basura y evitando el

¹A partir de ahora se utilizará la abreviación de su nombre, *E. coli*.

solapamiento. De esta manera se consiguen sistemas biológicos fácilmente comprensibles por los humanos y, por consiguiente, fácilmente modificables. Otro campo de investigación fuertemente influenciado por la informática es el diseño y construcción de sistemas biológicos capaces de procesar información.

A pesar de la multitud de trabajos realizados hasta ahora, sigue siendo complicado cuando se trata de comunidades microbianas, ya que son sistemas complejos difíciles de simplificar y explicar. El presente documento versa, precisamente, sobre sistemas bacterianos complejos capaces de comunicarse. Motivado por la necesidad de conocer las nuevas herramientas y enfoques necesarios para hacer frente a los desafíos de construir modelos que expliquen estos sistemas microbiológicos.

Los modelos en microbiología se distinguen por sus diferentes escalas. A grandes rasgos, se distinguen tres niveles (nivel molecular, celular y de población), de acuerdo con sus escalas espaciales y temporales.

- El nivel molecular se refiere a tamaños máximos de 10^9 átomos y escalas de tiempo de 10^{-15} a 10^{-4} segundos. Este nivel estudia las estructuras y comportamientos de las biomoléculas.
- El nivel celular concierne tamaños de media 10^{13} átomos y tiempos del orden de 10^{-3} segundos hasta algunas horas, como es la replicación del ADN. Este nivel alberga todos los procesos metabólicos que ocurren dentro de la célula.
- El nivel de población cuyo tamaño son poblaciones de 10^{10} células y tiempos que pueden durar de varias horas a algunos días. Este nivel engloba el estudio de las estructuras y la evolución de las comunidades microbianas. El documento se centra en el nivel de población o de colonia bacteriana.

La motivación, es el poder crear modelos para poder explicar comportamientos en sistemas complejos biológicos según sus condiciones iniciales como, por ejemplo, la dinámica existente detrás de la conjugación.

La biología sintética a un nivel de población ha generado herramientas de diagnóstico que mejoran la atención de pacientes con enfermedades infecciosas, así como dispositivos que oscilan [4], se mueven y juegan a piedra papel o tijera [5].

Este tipo de estudios, abre toda una serie de posibilidades para futuras líneas de investigación como por ejemplo:

1. INTRODUCCIÓN

- Interactuar directamente en organismos vivos.
- Trabajar a nanoescala, puesto que nos da la posibilidad de crear nanodispositivos programables para ejecutar determinadas tareas.
- Puede ser muy útil en el ámbito médico, biológico, farmacológico, agrícola y medioambiental.

1.2. Estructura del documento

Esta tesis muestra al lector, en una primera aproximación, lo que puede hacer una simple colonia de bacterias. Para ello, es necesario un capítulo que explique los mecanismos de comunicación que tienen las colonias de bacterias. Este capítulo puede resultar demasiado introductorio para personas que provengan de ciencias biológicas; lo mismo ocurre, en la parte que se explican los modelos matemáticos, para la comunidad de físicos y matemáticos. Sin embargo, la interdisciplinariedad del tema, hace necesario abordar temas introductorios de distintas áreas del conocimiento. La memoria se organiza de la siguiente manera:

- Capítulo I: introducción.
- Capítulo II, 1ª parte: definición e historia de la conjugación y quorum sensing.
- Capítulo II, 2ª parte: ejemplos reales con colonias de bacterias.
- Capítulo II, 3ª parte: modelos matemáticos de conjugación.
- Capítulo III: conclusiones y futuras líneas de investigación.
- Bibliografía

En la introducción se contextualiza la biología sintética y biología de sistemas.

En el segundo capítulo se explica, desde un punto de vista biológico, cómo se descubrió y en qué consisten los mecanismos de comunicación bacteriana. Primero se realiza una breve introducción del tema, luego se explica la conjugación y finalmente se explica como funciona el quorum sensing.

En el siguiente apartado se exponen distintos experimentos realizados sobre la conjugación. El primer experimento lo hicieron en la universidad de Berkeley para el IGEM

de 2006. El proyecto lo llamaron “Addressable Conjugation in Bacterial Networks”. Es una red de células que interactúa entre sí por medio a la conjugación. El segundo caso es de la universidad de Delf para el IGEM de 2009. Lo llamaron “Bacterial Relay Race”. Como su propio nombre indica, es una carrera de relevos entre dos colonias de bacterias. El testigo es un plásmido, que se pasa de bacteria en bacteria, gracias a la conjugación.

El final del segundo capítulo, explica las diferentes maneras de modelar las colonias de bacterias. El primer ejemplo, es un modelo clásico de crecimiento exponencial. Se basa en el documento de C. Lagido y sus colaboradores [6]. El segundo y tercer modelo, ya tienen en cuenta la distribución espacial. Se utilizan los IPS o sistemas estocásticos espaciales. La documentación se extrajo de dos trabajos realizados por la universidad de Idaho (S. Krone, E. Top y colaboradores [7], [8]). Y en el último modelo se utilizan ODEs o ecuaciones diferenciales ordinarias. Permiten modelizar sistemas homogéneos, en los que todos sus elementos están bien mezclados. La información se obtuvo de un trabajo realizado en 2010 por E. Top y sus colaboradores [9].

Finalmente se manifiestan las conclusiones obtenidas del documento, y las investigaciones futuras que se quieren realizar.

La bibliografía es todo el material y documentación científica utilizada.

1. INTRODUCCIÓN

2

Estado de la cuestión

2.1. Comunicación entre bacterias

2.1.1. Introducción

Tradicionalmente, la cooperación social se ha considerado en organismos superiores. Actualmente los biólogos han comenzado a apreciar que las bacterias también son criaturas atractivas para el estudio de esta temática. Las bacterias, al igual que los organismos superiores, presentan comportamientos complejos de cooperación, como: la transferencia conjugativa de plásmidos, la maduración en biofilm, la virulencia, la simbiosis, y la adaptación a un lugar. También cuentan con mecanismos de defensa frente a organismos superiores y facilitan la migración de la población de un sitio donde las condiciones se han convertido en desfavorables a otro más favorable. Muchos de estos comportamientos son regulados por un proceso conocido como detección de quórum o quorum sensing.

Desde las afirmaciones de van Leeuwenhoek, de hace 300 años, en las que dijo, que el mundo está lleno de microorganismos, una de las ideas que se tenían en microbiología era la concepción de las bacterias como organismos asociales, cuya única actividad era dividirse para generar nuevas bacterias. Sin embargo, desde hace poco más de 60 años se ha sugerido que, lejos de esta conducta aislada, puede existir una conducta bacteriana en grupo. Los microbiólogos han descubierto que las células procariontes pueden intercambiar información unas con otras, mediante distintos procesos. En las décadas de 1960 y 1970, con el descubrimiento del que ahora se llama quorum sensing, se demostró, que las bacterias poseen mecanismos de comunicación que les permiten enviar y recibir

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

mensajes químicos entre ellas, y entre ellas y células eucariotas. En algunos casos, las interacciones sociales permiten que las bacterias sincronicen el comportamiento de todos los miembros del grupo, y por lo tanto, actúan como organismos multicelulares. Por el contrario, otros compromisos sociales entre los miembros del grupo, promueven la individualidad dentro del grupo y con ello fomentan la diversidad.

Todas estas formas de comunicarse son directas. También se han realizado experimentos demostrando [10], que si se modifican ciertas variables del entorno, el sistema cambia su comportamiento. A estos mecanismos de comunicación se les conoce como indirectos, ya que no se tiene en cuenta la interacción entre los individuos.

A continuación se analizan detalladamente la conjugación y el quorum sensing.

2.1.2. Conjugación

La conjugación bacteriana es el proceso de transferencia horizontal de información genética desde una célula donadora a otra receptora. Está promovido por un tipo de plásmidos, que portan un conjunto de genes, cuyos productos participan en el proceso. Requiere de contactos directos para la intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas.

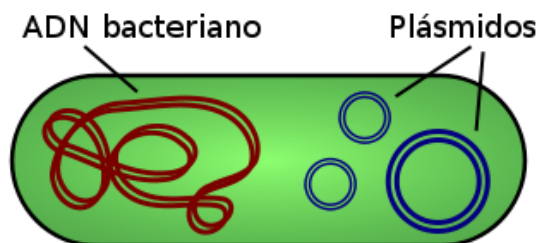


Figura 2.1: Material genético - Esquema del material genético de una bacteria. Esta imagen se encuentra bajo la licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 2.5.

Algunos de estos plásmidos se comportan como episomas. En este caso, si se produce la conjugación, se puede transferir el propio plásmido, más, un segmento adyacente del cromosoma, que a su vez, podrá recombinarse con secuencias homólogas del cromosoma receptor, dando lugar a un cromosoma híbrido.

¿Por qué se produce la conjugación bacteriana?. Las bacterias como son asexuales no pueden transferir su material genético de una generación a otra, por lo que necesitan un

mecanismo para este propósito. La conjugación es un proceso de transferencia genética horizontal (TGH), también conocida como transferencia de genes lateral (TGL), en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es su descendiente. Por el contrario, la transferencia vertical ocurre cuando un organismo recibe material genético de sus ancestros, por ejemplo, de sus padres o de una especie de la que ha evolucionado.

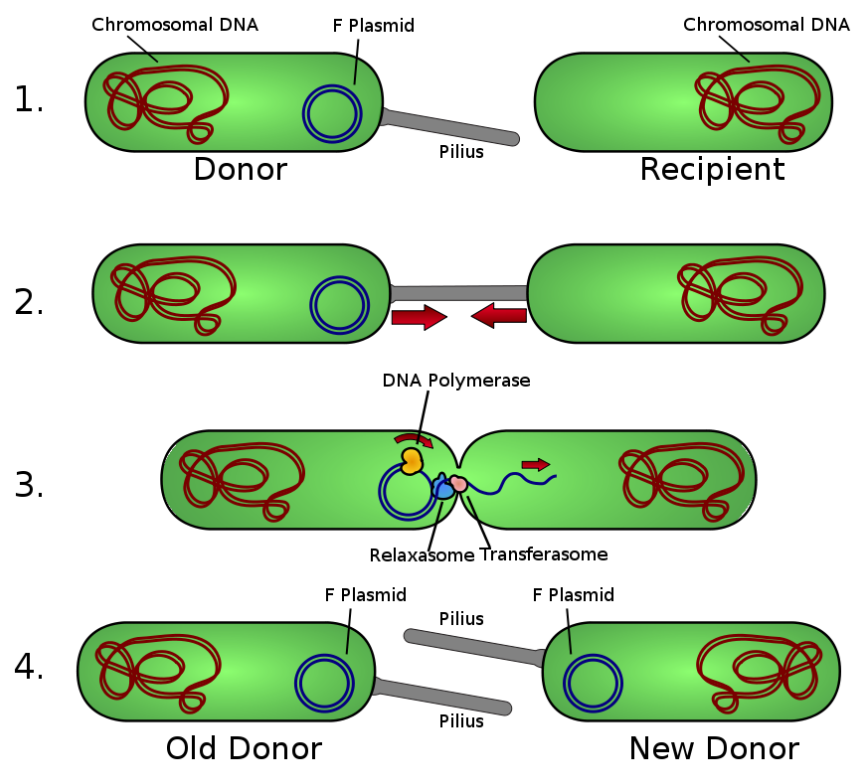


Figura 2.2: Conjugación bacteriana - Esquema de la conjugación bacteriana. Esta imagen se encuentra bajo la licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 3.0.

Las bacterias a parte del cromosoma o material genético indispensable, contienen moléculas de ADN extracromosómicas con forma circular o lineal, que también se replican y se transcriben, aunque de manera independiente al ADN cromosómico. Estas moléculas de ADN son conocidas como plásmidos. Algunos plásmidos son los que transportan la información de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la conjugación.

Existe una amplia variedad de plásmidos, y los podemos clasificar en función de

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

diferentes criterios:

1. Si contienen la maquinaria de conjugación o no:
 - a) Conjugativos.
 - b) No-conjugativos. Dentro de esta categoría pueden ser:
 - 1) No movilizables (no pasan de una bacteria a otra).
 - 2) Movilizables por otros que sí son conjugativos (pasando a otra bacteria).
2. Según su control de replicación:
 - a) Plásmidos de control estricto del número de copias (tienen un bajo número de copias). Suelen ser plásmidos de tamaños medianos (unas 30 kilobases ¹ o kb) a grandes (cientos de kb). Por ejemplo, el plásmido F que contiene 1-2 copias.
 - b) Plásmidos de control relajado: (tienen un alto número de copias, más de 10). Suelen ser plásmidos pequeños (menos de 10 kb). Algunos de ellos tienen un sistema de replicación especial, y son amplificables cuando a las bacterias que los poseen se les añade cloramfenicol [11]. De esta manera se “amplifica” o aumenta, aún más, su proporción.
3. Según el tipo de fenotipos que codifican (dejando aparte los plásmidos crípticos, de los que se desconoce su función fenotípica):
 - a) Plásmidos R, que codifican una o más resistencias a drogas (antibióticos) y/o resistencia a metales pesados.
 - b) Plásmidos bacteriocinogénicos, que codifican alguna bacteriocina. Los más estudiados son los plásmidos *Col*, que producen colicinas (bacteriocinas de la *E. coli*).
 - c) Plásmidos de virulencia, encargados de codificar funciones relacionadas con la virulencia en muchas bacterias patógenas.
 - d) Plásmidos que codifican factores de colonización (para la invasión de los tejidos de su hospedador).

¹A partir de ahora se utilizará la abreviatura kb.

- e) Plásmidos que confieren rutas metabólicas capaces de utilizar como fuentes de carbono y energía sustancias que otros organismos no pueden catabolizar.
 - f) Plásmidos responsables de funciones relacionadas con el establecimiento de las simbiosis fijadoras de nitrógeno en los nódulos radicales de las leguminosas (*pSym* y otros tipos).
 - g) Plásmidos responsables de la producción de tumores en numerosas plantas dicotiledóneas.
 - h) Existen igualmente plásmidos que codifican más de una clase de fenotipos, como por ejemplo, plásmidos que son resistentes a antibióticos y tienen capacidad de virulencia.
4. Plásmidos según el grupo de incompatibilidad. Dos plásmidos son incompatibles (no pueden permanecer establemente en la misma célula) porque comparten un mismo sistema de replicación y de segregación de las copias. Los plásmidos pueden clasificarse según su pertenencia a un mismo grupo de incompatibilidad, obsérvese la siguiente tabla 2.1

| Grupo de Incompatibilidad | Plásmidos |
|---------------------------|-----------------------|
| FI | R386 |
| FII | R1 |
| FIII | Col B-K99, Col B-K166 |
| FIV | R124 |
| I | R62, R64, R483 |
| J | R391 |
| N | R46 |
| O | R724 |
| P | RP4, RK2 |
| Q | RSF1010 |
| T | R401 |
| W | R388, S-a |
| X | R6K |

Tabla 2.1: Grupos de incompatibilidad.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Descubrimiento de la conjugación

En 1946, Joshua Lederberg y Edward Tatum publicaron un artículo en el *Journal of Bacteriology*, titulado “*Gene Recombination in the Bacterium Escherichia coli*”. Este artículo describe un nuevo método de transferencia genética entre bacterias, la conjugación, que iba a revolucionar todo el campo de la genética bacteriana.

Lederberg y Tatum, realizaron un experimento con la bacteria *E. coli* que se esquematiza en la figura 2.3. La clave para la comprensión del experimento, es el concepto de cepas de bacterias mutadas nutricionalmente. Una cepa mutada de *E. coli* es una cepa dependiente de un factor de crecimiento específico, como un aminoácido (por ejemplo, la arginina, histidina, etc) u otro factor, y no crece en medios que no se han enriquecido con ese factor de crecimiento.

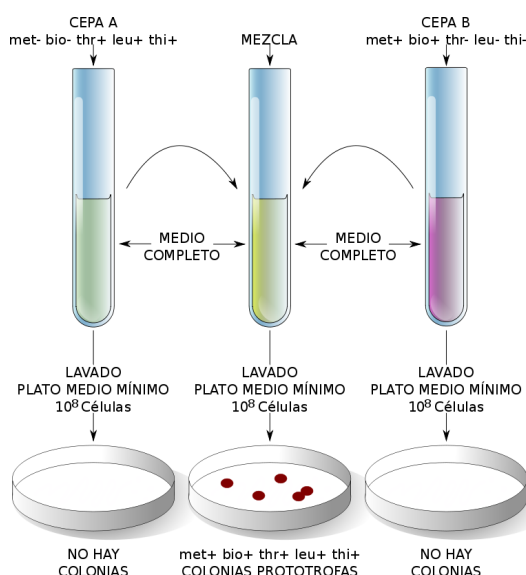


Figura 2.3: Experimento de Lederberg y Tatum - Las células de tipo *A* o tipo *B* no pueden crecer sin sus factores de crecimiento o en un medio mínimo (MM), ya que *A* y *B* tienen mutaciones que causan la incapacidad de sintetizar los componentes necesarios para el crecimiento celular. Cuando *A* y *B* se mezclan por unas horas y se vierten en una placa con MM, entonces aparecen algunas colonias. Estas colonias derivan de las células individuales en las que se ha producido un intercambio de material genético, por lo que son capaces de sintetizar todos los componentes necesarios para el crecimiento, obtenido con permiso de: Conjugación Bacteriana I, Ramón Giraldez, y año 2005.

Lederberg, antes de unirse al Dr. Tatum en Yale, realizó una investigación utilizando cepas con una sola mutación, y fracasó, debido a que las células que fueron capaces

de sintetizar los factores de crecimiento. Eran aproximadamente las mismas células que cabría esperar teniendo en cuenta tasas de mutación espontánea normales. Lederberg sabía que el Dr. Tatum trabajaba con cepas de doble mutación, y se fue a Yale para continuar la investigación. Estas cepas demostraron ser de gran valor, ya que la frecuencia de dos mutaciones espontáneas es extremadamente baja.

Para llevar a cabo el experimento, Lederberg y Tatum utilizaron dos cepas diferentes *A* y *B*, con doble mutación nutricional. La cepa *A* necesita los aminoácidos, metionina y biotina (*met*−*bio*−*thr*+*leu*+*thi*+), para su crecimiento, mientras que la *B*, necesita, creonina, leucina y vitamina B1 o tiamina(*met*+*bio*+*thr*−*leu*−*thi*−). Hicieron tres cultivos. Uno de cada cepa por separado, y otro combinación de ambas. Estos cultivos se incubaron en una solución que contienen los factores de crecimiento necesarios para ambas cepas. Después de un período de incubación, recogieron las bacterias resultantes. Cada cultivo se colocó en un medio mínimo sin factores de crecimiento. Como era de esperar, no hubo crecimiento en las placas de los cultivos con cepas individuales. Sin embargo, en la placa del cultivo con la mezcla de las dos cepas, se observó que unas pocas tenían la capacidad de crecer en el medio mínimo (una de cada 10 millones de células, 1×10^{-7}). La aparición de estas colonias sólo puede explicarse por la recombinación genética entre las dos cepas, ya que la probabilidad teórica de que aparecieran por doble mutación es casi nula, corroborándolo las otras dos placas, cuando se cultivan las cepas por separado. Sin embargo, tuvo que llevar a cabo dos pruebas más antes de poder reclamar el descubrimiento de la conjugación.

La primera prueba, tenía como objetivo, descartar la posibilidad de que una de las cepas pudiera haber recogido el ADN liberado por la otra. El proceso por el cual, las células toman el ADN libre y lo incorporan en su cromosoma, se conoce como transformación. Para descartar la transformación, Lederberg y Tatum incubaron un cultivo de una cepa, con el filtrado de la otra cepa. El filtrado, retiene las células vivas, dejando pasar las moléculas libres de ADN. Cuando esta combinación se sembró en placas de agar mínimo, no hubo crecimiento. Esto demostró que la transformación no estuvo involucrada en el proceso, y el ADN libre no fue el responsable del crecimiento en las placas.

Necesidad del contacto directo entre células para que se produzca la conjugación

La segunda prueba la llevaron a cabo, para desechar la posibilidad de que una cepa de *E. coli* pueda secretar metabolitos que acaben siendo utilizados por la otra cepa para

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

poder crecer. Para demostrar que esto no era así, Bernard Davis en 1950 diseñó un tubo cuya forma es similar a una *U* con un filtro en la parte inferior. En este experimento, se utilizaron los dos cultivos *A* y *B*, previamente estudiados por Lederberg, colocando cada cultivo en uno y otro lado del filtro. Los poros del filtro eran demasiado pequeños para permitir que las bacterias pasaran a través de él, pero lo suficientemente grandes como para permitir el paso de metabolitos y aminoácidos. Un extremo del tubo, está provisto de una cánula para insuflar y extraer aire (véase figura 2.4), y así obtener una mezcla homogénea del medio de cultivo. Con este tubo se consigue que las dos cepas compartan el mismo medio de cultivo pero no estén en contacto. Después de la incubación de las cepas durante un tiempo, pusieron el cultivo de cada brazo del tubo en *U*, sobre placas con un medio mínimo separadas, y observaron que no existía crecimiento alguno. Lo que demuestra que los metabolitos no fueron los que causaron el crecimiento en el primer experimento. Además se observó, que para que aparezcan bacterias recombinantes y se produzca la conjugación, es necesario el contacto físico entre ambas cepas.

Participación desigual de las células conjugantes: donantes y receptoras

Se pensó en la posibilidad de que la conjugación consistiera en algo parecido a lo que ocurre en células eucariotas, con la formación del cigoto y la segregación de células haploides entre las que se encontrarían las células recombinantes (véase figura 2.5). Esta hipótesis resultó ser falsa.

En 1953, William Hayes, determinó que la transferencia genética se producía en una dirección. Por lo tanto, la transferencia del material genético de la *E. coli* no es recíproca. El investigador, realizó una serie de experimentos sobre la conjugación, a partir del cruce entre las dos cepas *A* y *B*. En la siguiente figura 2.6 se indican esquemáticamente los experimentos. Desarrolló los siguientes cultivos: el primer cultivo es, la cepa *A* tratada con una fuerte dosis de estreptomina combinaba con una cepa *B* sin tratar. Mientras que el segundo cultivo, es justamente al revés. La cepa *B* es la que se somete al tratamiento con estreptomina y la cepa *A* se mantiene sin tratar. Cuando los dos cultivos se pusieron sobre las placas con un medio mínimo, el número de recombinantes del primer cultivo era prácticamente el mismo al que se obtenía sin el tratamiento con estreptomina. Mientras que en el segundo cultivo, no aparecían recombinantes. Se puede extraer de estos resultados, que existen unas células donadoras (cepa *A*) que transfieren información a las células receptoras (cepa *B*). La existencia de cepas donadoras y receptoras explicaría las observaciones anteriores. Así, dos cepas donadoras

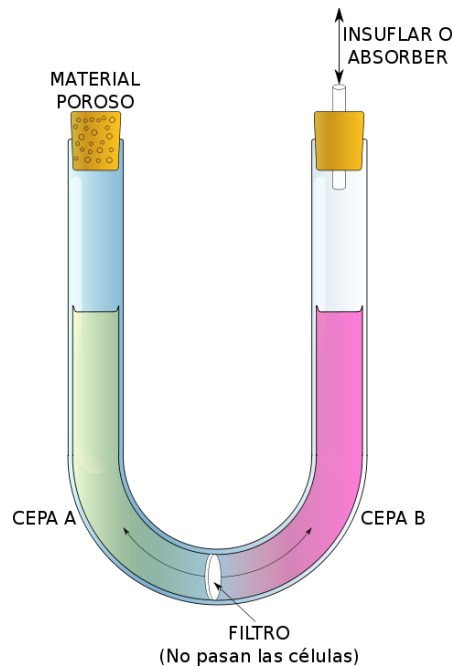


Figura 2.4: Experimento de Davis - Este experimento muestra que el contacto físico entre las bacterias es necesario para que la recombinación genética tenga lugar. En un brazo de tubo conforma de *U* se coloca una cepa y en el otro brazo se coloca la otra cepa. En el centro del tubo se coloca un filtro, que permite, que el líquido, los metabolitos y los aminoácidos puedan pasar de un brazo a otro del tubo, gracias a la presión o succión, no ocurriendo esto con las bacterias. Después de varias horas de incubación, las células son colocadas en una placa con un medio mínimo, pero las colonias no crecen, obtenido con permiso de: Conjugación Bacteriana I, Ramón Giraldez, y año 2005.

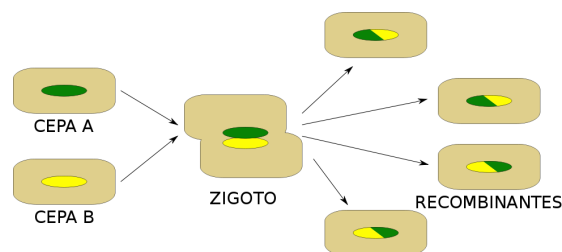


Figura 2.5: Cigoto - Esquema de la formación de un cigoto, obtenido con permiso de: Conjugación Bacteriana I, Ramón Giraldez, y año 2005.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

pueden intercambiar información en los dos sentidos, siendo capaces de actuar tanto como de donantes, como de receptoras. Sin embargo, dos cepas que sólo son receptoras no consiguen intercambiar información.

Este tipo de transferencia unidireccional, no recíproca, se comparó inicialmente como una diferencia sexual. La bacteria donadora es la célula “macho” y la receptora es la “hembra”. Sin embargo, este tipo de transferencia de genes no es como la reproducción sexual. En la conjugación entre bacterias, el organismo receptor recibe la información genética del donador, y la incorpora como material genético propio. En la reproducción sexual, los dos organismos donan información genética por igual (o casi) para la formación de un nuevo organismo, y sólo en casos excepcionales, uno de los donadores cambia.

Maquinaria necesaria para la conjugación

Aunque existen diferentes plásmidos para realizar la conjugación, como son el F, RP4, R751 o el R388, entre otros, su maquinaria funcional es la misma pese a que sus proteínas son distintas.

La molécula de ADN que se va a transferir, debe llevar el origen de transferencia ¹ u oriT. Es una secuencia corta de ADN, esta cadena marca donde comienza y termina la conjugación. El resto de la maquinaria de conjugación son como mínimo quince proteínas que llevan a cabo diferentes funciones necesarias para que se produzca la conjugación.

La conjugación tiene tres módulos funcionales:

1. **El substrato “selector”** es un complejo de proteínas, también conocido como relaxosoma. Lo conforman el oriT, la relaxasa y alguna proteína más que permite cortar. La relaxasa corta en el oriT la cadena de ADN que va a ser transferida. Al final del proceso, se supone, que la relaxasa vuelve a pegar la cadena de ADN. Las relaxasas actúan específicamente sobre sus oriT afines, y no en los de plásmidos relacionados.
2. **El conducto o “conduit” transmembranal** es un complejo multiproteico, formado por cerca de 10 proteínas, que abarca tanto la membrana interna como la

¹A partir de ahora se utilizará la abreviatura oriT.

2.1 Comunicación entre bacterias

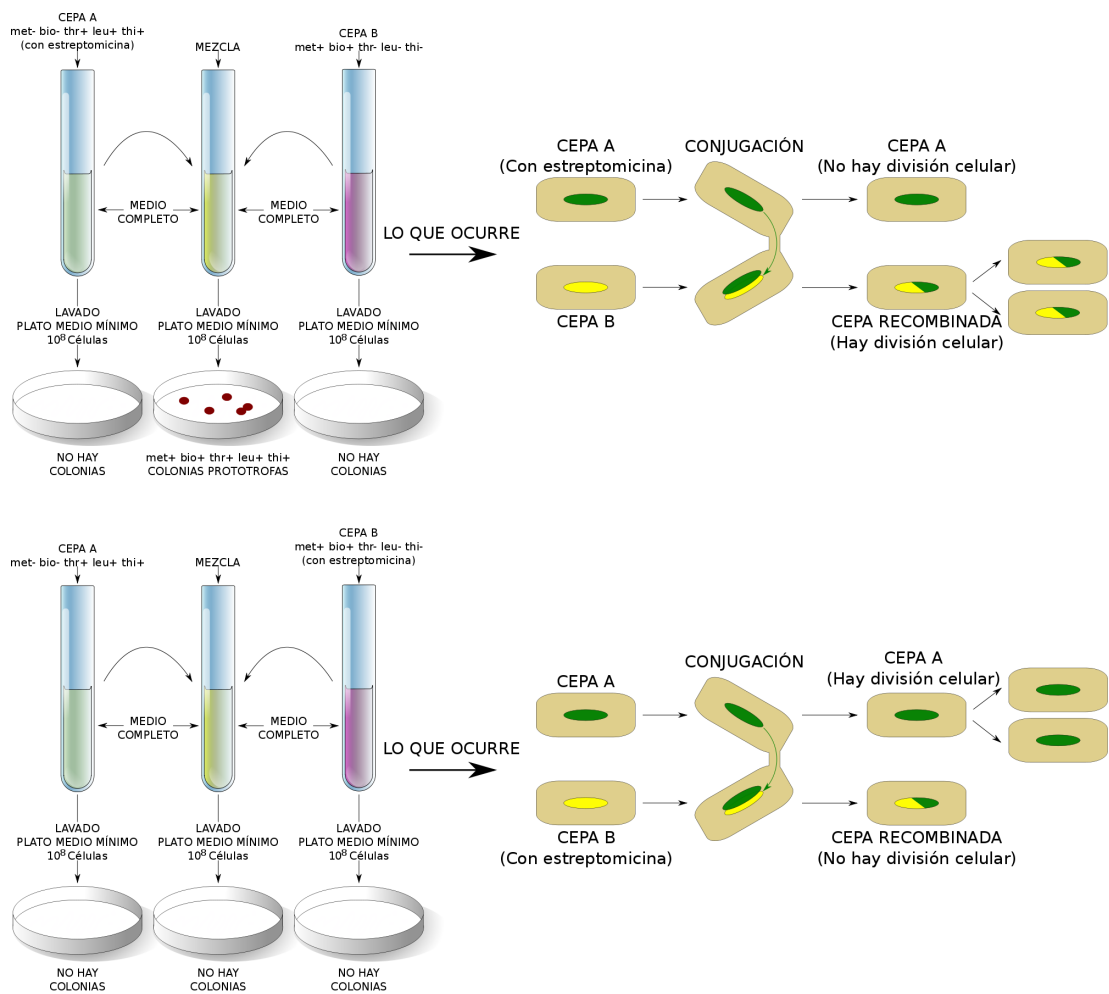


Figura 2.6: Experimento de Hayes - Esquema del experimento realizado por Hayes, obtenido con permiso de: Conjugación Bacteriana I, Ramón Giraldez, y año 2005.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

externa. Sus componentes pertenecen a la familia de transportadores de proteínas conocida como sistema de secreción tipo IV ¹ o T4SS.

3. **La proteína de acoplamiento (CP) o “coupling protein”** acopla el “selector” con el “conduit” y, a parte, está provisto de una especie de bombas que permiten impulsar la hebra de ADN al receptor.

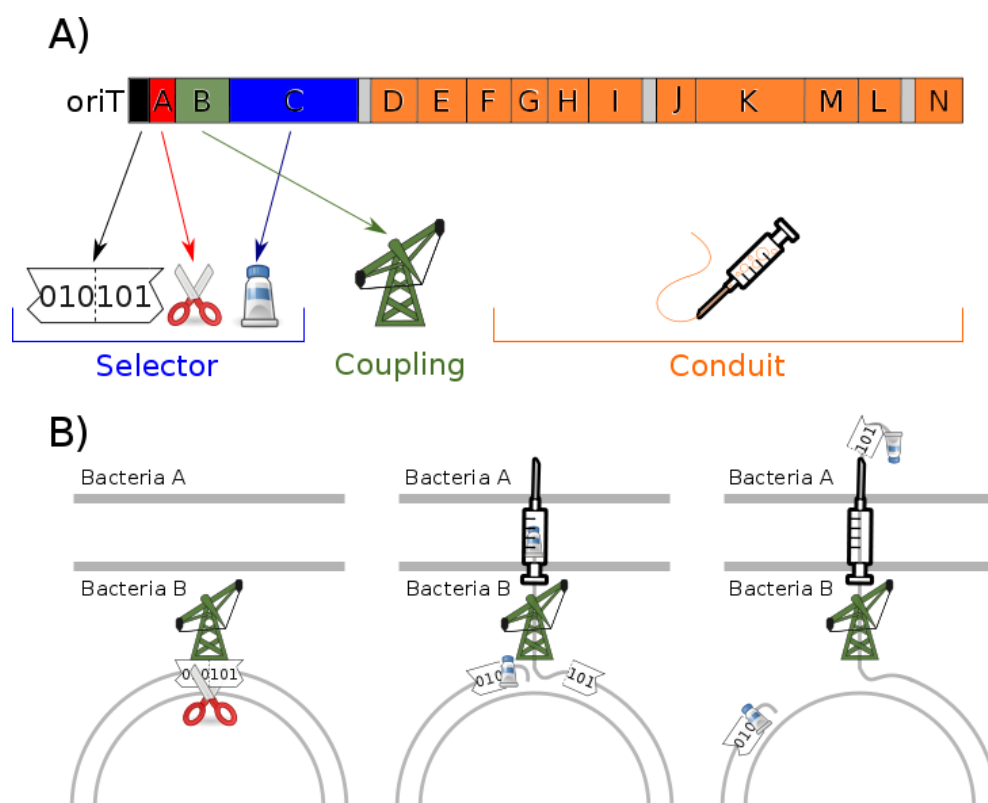


Figura 2.7: Maquinaria de conjugación - Esquema de la maquinaria de conjugación. Estructura y funcionamiento del sistema conjugativo para la transferencia de ADN. (a) Organización genética de la región de transferencia del plásmido R388 y sus correspondientes proteínas. El prefijo trw de los genes ha sido omitido por claridad. La proteínas están organizadas según su módulo funcional. (b) Esquema del modelo “shoot-and-pump” para la transferencia de ADN. Paso 1: la relaxasa es impulsada a través del conducto T4SS, con el final de la cadena de ADN complementaria. Paso 2: el ADN restante se va bombeando gracias al CP. Paso 3: una vez en la bacteria receptora la relaxasa pega el material transferido. Obtenido con permiso de: [12] “Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering”, M. Llosa y F. de la Cruz, Research in Microbiology, y año 2005.

¹A partir de ahora se utilizará la abreviatura T4SS.

Ejemplo prototipo del plásmido F

El prototipo de plásmido conjugativo es el plásmido F, o también conocido como factor-F. El plásmido F es un episoma, tiene una longitud de 100 kb. Tiene un origen de replicación u oriV, al igual que su origen de transferencia u oriT. Solo puede tener una copia de él en cada bacteria (dos antes de la división celular). Las bacterias huésped se llaman F-positivas o F-más (se denotan con F+). Las cepas que carecen de plásmidos F se llaman F-negativo o F-menos (F-).

Entre la información genética, el plásmido F tiene dos conjuntos el tra y el trb. Son aproximadamente de 33 kb de largo, y se componen por alrededor de 40 genes. El conjunto tra incluye el gen pilin y genes reguladores, que en conjunto forman los pili en la superficie celular. Estas proteínas pueden adherirse a la superficie de las bacterias F- e iniciar la conjugación, aunque existe cierto debate sobre el mecanismo exacto, los pili no parecen ser las estructuras que lleven a cabo el intercambio de ADN. Algunas proteínas codificadas en el conjunto tra o trb parecen abrir un canal entre las bacterias. Se cree que la enzima traD ubicada en la base del pilus, está involucrada en el intercambio de ADN al iniciar la unión de las membranas.

Cuando se inicia la conjugación, la enzima relaxasa hace un corte en el oriT de una hebra de ADN del plásmido. La relaxasa puede trabajar sola o en un complejo con doce proteínas más, conocido como relaxosoma. En el sistema del plásmido F, la relaxasa se llama TraI y el relaxosoma está compuesto por TraI, TraY, TraM y un factor integrado en el huésped, el IHF. La hebra transferida o hebra-T, es desenrollada de la doble hebra del plásmido y transferida a la bacteria receptora con una dirección 5'-3'. Se replica la cadena independientemente de la acción de conjugación (replicación comienza en oriV) o a la vez que la conjugación (replicación conjugativa), es parecida a la replicación "rolling circle" del fago lambda. La replicación conjugativa puede requerir de otro segundo corte antes de que la transferencia sea hecha. Un estudio realizado permite inhibir la conjugación con productos químicos que imitan el segundo corte [13].

Si el plásmido F se integra en el genoma de la célula huésped, el cromosoma de la célula donadora puede ser transferido como un plásmido. La cantidad de ADN transferido, depende de cuánto tiempo están las bacterias en contacto; para cepas de E. coli, la transferencia del cromosoma entero podría llevar en torno a los 100 minutos. El ADN transferido puede ser integrado en el genoma receptor vía recombinación homóloga.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

2.1.3. Quorum sensing

En su forma más simple, el quorum sensing, es un mecanismo de comunicación entre células. Las bacterias son capaces de saber cuantas son, mediante la producción y detección de la acumulación de una molécula de señalización que exportan en su entorno. Dichas moléculas podrían ser consideradas como feromonas. El término fue acuñado por Karlson y Luscher (1959) del griego “pherein” (transferir) y “hormon” (excitar). A diferencia de las hormonas, las feromonas son expulsadas fuera del organismo, facilitando la comunicación entre ellos. A estas feromonas se las denomina autoinductores, por ser una de sus funciones estimular su propia síntesis. La presencia de estos autoinductores en el medio, van a permitir a las bacterias determinar el tamaño de la población. A medida que el cultivo bacteriano crece, las moléculas de señalización se van liberando en el medio extracelular. Una vez que se llega a un umbral en la concentración de la molécula (y por lo tanto una densidad de población específicos), se inicia un cambio coordinado en el comportamiento de las bacterias.

Para que una molécula sea clasificada como una señal de quorum sensing, hay una serie de criterios importantes que se deben cumplir:

1. La producción de la señal de quorum sensing debe llevarse a cabo durante etapas específicas de crecimiento, o en respuesta particular a cambios ambientales.
2. La señal de quorum sensing debe poder acumularse en el ambiente extracelular y ser reconocida por las bacterias receptoras.
3. La acumulación de la señal de quorum sensing a un umbral crítico de concentración, debe estimular una respuesta.
4. La respuesta celular debe extenderse más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar la molécula.

En lugar de una lengua para comunicarse, las bacterias utilizan distintas moléculas de señalización que liberan en el medio. En un medio natural, hay muchos tipos de bacterias que viven juntas y que utilizan distintas clases de moléculas de señalización. Al hablarse diferentes “lenguas”, una bacteria no siempre puede hablar con todas las demás.

El proceso de quorum sensing se puede ver de la siguiente manera: se considera una población de bacterias, en la que cada bacteria es capaz de producir una molécula de señalización o autoinductor, y cada bacteria tiene un receptor de moléculas de señalización. Cuando el autoinductor se une al receptor, activa la transcripción de ciertos genes, incluidos los responsables de la síntesis del propio autoinductor. En un entorno con pocas bacterias de la misma naturaleza, la concentración del autoinductor en el medio circundante es insignificante, por lo que cada bacteria produce una cantidad muy pequeña del autoinductor. Sin embargo, a medida que la población bacteriana crece, la concentración del autoinductor va en aumento, sintetizándose más moléculas autoinductoras (véase figura 2.8). Esto forma un bucle de retroalimentación positiva¹ o feedback positivo y la concentración de la molécula sigue aumentando. Una vez que la concentración alcanza el límite, el receptor se acciona, conduciendo a la activación de unos determinados genes, dando lugar a una respuesta coordinada de la población. El quorum sensing, por lo tanto, permite a las bacterias coordinar y responder rápidamente a cambios ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, otros microbios o toxinas en su entorno, y así, cosechar beneficios que nunca podrían obtener por si solas.

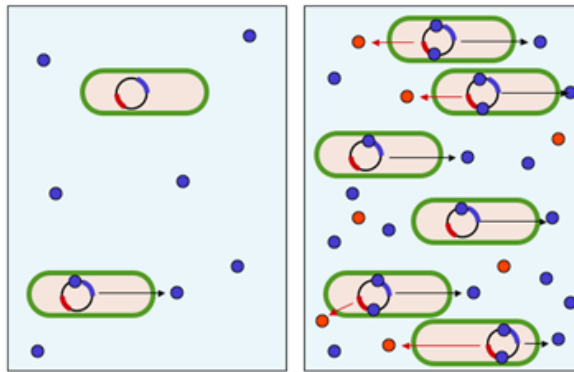


Figura 2.8: Quorum sensing - Diagrama del quorum sensing. A la izquierda, la población de células y la concentración de la molécula autoinductora (puntos azules) son bajas, por lo que la sustancia (puntos rojos) no se produce. Esto sí sucede cuando la población ha aumentado y la concentración del autoinductor es alta (derecha de la imagen). Esta imagen se encuentra bajo la licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 3.0.

¹A partir de ahora se utilizará la terminología más usual, en la literatura científica, *feedback positivo*.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Este proceso supone una ventaja adaptativa para las bacterias, ya que les permite interactuar socialmente, especialmente en entornos en los que las bacterias no pueden dispersarse fácilmente, como el interior de un huésped, el material de un hospital, las aguas estancadas, los biofilms, etc.

El quorum quenching [14], es un mecanismo en el que algunas bacterias pueden interrumpir la “conversación” que mantenía una población inicial de otra especie distinta, confundiéndolas e inhibiendo su comportamiento social. Sabiendo que la virulencia, en algunos organismos, está regulada por quorum sensing, este dispositivo ha despertado un amplio interés, para poder ser capaz de bloquear la comunicación.

En 1962, McVittie y sus colaboradores [15], con sus trabajos sobre el *Myxococcus xanthus* y el *Streptomyces griseus* en su formación de cuerpos fructíferos y su producción de estreptomicina, demostraron empíricamente que las bacterias no se desarrollan de manera aislada. El concepto de la comunicación intercelular dentro de una población bacteriana se origina con los descubrimientos de Tomasz [16] sobre la competencia genética en *Streptococcus pneumoniae* (entonces conocido como *Pneumococcus*) y Hastings [17] sobre la bioluminiscencia en *Vibrio*.

En 1965, Tomasz, afirmó que el estado de competencia, se rige por un factor extracelular que es aportado por el propio *Streptococcus* [16]. Por lo tanto, el factor de competencia, que más tarde demostró ser un péptido, fue descrito, como un activador similar a las hormonas que sincroniza el comportamiento de una población bacteriana.

En 1970, Hastings y Nealson, demostraron que dos especies de bacterias marinas bioluminiscentes, *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, producen luz cuando sus densidades son altas, pero no cuando se encuentran diluidas en bajas densidades [17]. Estas bacterias gram-negativas viven como simbioses en algunas especies animales marinas. En esta relación el huésped provee de nutrientes a la bacteria y la bacteria a cambio genera luz que sirve al animal para atraer a sus presas y alejar a los depredadores. La bioluminiscencia, se produce por la adición en el medio ambiente de una molécula conocida como autoinductor, más tarde se mostró que era el acyl-homoserine lactone (AHL; [18]). Las conclusiones de Tomasz y Hastings, proponen que ciertas bacterias utilizan la producción, liberación, el intercambio, y la detección de moléculas de señalización, para medir su densidad de población y controlar su comportamiento en respuesta a las variaciones en el número de células.

Durante casi 20 años, estas moléculas de señalización celular, fueron consideradas como algo anómalo limitado a un conjunto de bacterias especializadas. Por ejemplo, a principios de los 1990, se demostró que el antibiótico β -lactam, que actúa sobre el patógeno *Erwinia carotovora* de algunas plantas terrestres, era regulado por AHLs. Fuqua [19] introdujo el término quorum sensing para describir este fenómeno. Desde entonces, se ha demostrado que muchas especies de bacterias gram-negativas tienen mecanismos de quorum sensing que regulan una gran variedad de fenotipos diferentes. El quorum sensing no se limita a las bacterias gram-negativas, se ha observado que un gran número de microorganismos gram-positivos emplean pequeños oligopéptidos, como moléculas de señalización. Ahora, está claro que la comunicación intercelular no es una singularidad sino, más bien, es la norma del mundo bacteriano y que este proceso, llamado quorum sensing, es fundamental en la microbiología moderna.

Básicamente existen dos formas de comunicarse con las demás bacterias: una es la comunicación vía péptidos y la otra es la comunicación a través de acil homoseri-na lactonas (AHL), lenguajes usados por bacterias gram-positivas y proteobacterias respectivamente [20], [21].

1. AHL: Las bacterias gram-negativas como la *Vibrio* se comunican con distintos AHLs, que son productos de sintasas autoinductoras tipo LuxI. Estas pequeñas moléculas son detectadas por las proteínas citoplasmáticas afines LuxR que, al unirse con el autoinductor, se pegan al ADN y activan la transcripción del gen objetivo (véase figura 2.9).
2. Péptidos: Las bacterias gram-positivas como los *Streptococcus* y los *Bacillus*, se comunican con péptidos cortos o oligopéptidos que a menudo contienen modificaciones químicas. Péptidos como el ComX son reconocidos por sensores de la membrana. La transducción de la señal se produce por cascadas bioquímicas de fosforilación que finalmente inciden sobre los factores de transcripción del ADN responsable de la regulación de los genes objetivo.

Hay que tener cuidado cuando se describe el quorum sensing. Puesto que el tamaño de la señal, no es fijo, sino que variará en función de la velocidad relativa de la producción y la pérdida de las moléculas de señalización, es decir, depende de las condiciones ambientales locales. También es posible que una sola célula bacteriana pueda pasar del “no quorum” al “quorum” como se ha observado para el *Staphylococcus aureus* dentro

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

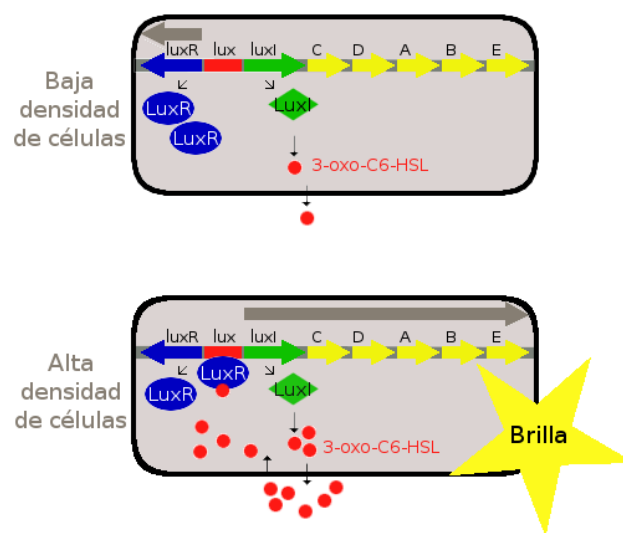


Figura 2.9: Quorum sensing en bacterias gram-negativas - En *V. fischeri*, la molécula de señalización (3-oxo-C6-HSL) se sintetiza gracias a la proteína *LuxI* y es detectada por la proteína *LuxR* (Arriba). Cuando hay pocas bacterias cercanas, la célula produce muy poco AHL (Abajo). Dado que la concentración de células en el entorno aumenta, la señal se acumula. El AHL se une a *LuxR* y el complejo *LuxR*/AHL se pega al promotor *lux*. Esto activa la transcripción de los genes cuyos productos dan lugar a la luminiscencia. La producción de *LuxI* también aumenta, dando lugar a una mayor concentración de la AHL. Se han identificado más de 25 especies de bacterias gram-negativas, con mecanismos de quorum sensing equivalentes al de las proteínas *LuxR* y *LuxI*.

de un endosoma en las células endoteliales [22]. En este contexto, “la detección de la difusión” sería un término más apropiado, ya que las moléculas de señalización son la información con respecto al medio ambiente local en lugar de la densidad de población [23], [24]. El quorum sensing, podría ser considerado como una categoría especial de la detección de la difusión. Cuando en un entorno determinado, el umbral necesario de concentración de autoinductores para la activación de una respuesta, sólo puede ser alcanzado por más de una célula [23], [24]. Por otra parte, cabe recordar que el quorum sensing, es determinante en la densidad poblacional, pero esta es sólo una de las muchas señales ambientales (por ejemplo, temperatura, pH, la falta de nutrientes, etc.) que las bacterias deben integrar para su supervivencia [25]. Por lo tanto, el quorum sensing es un componente de las redes globales reguladoras de los genes que son responsables de facilitar la adaptación bacteriana al estrés ambiental.

También se debe ser cauteloso cuando se describen los sistemas de quorum sensing y los sistemas de señalización, como la comprensión de la verdadera naturaleza de la interacción entre las células. Esto es importante si se quiere desarrollar con éxito circuitos basados en quorum sensing. Para que una molécula sea clasificada como señal, un receptor debería beneficiarse con su activación y esta activación debe beneficiar también a las células productoras. Por otra parte, una molécula de señalización puede ser utilizada como una señal para un receptor, que puede desembocar en una acción futura. En este caso, la molécula no beneficia a los productores y, por tanto, no puede definirse estrictamente como una señal. Una tercera posibilidad, es que una molécula puede “forzar” al receptor a realizar una acción, que puede ser perjudicial para su estado físico, sin embargo, esta acción beneficia a la célula productora. De nuevo, esto no puede calificarse como una señal de verdad. Uno de los futuros desafíos para los investigadores del quorum sensing es determinar cuál de estos tipos de interacción se da. Esto cobra especial importancia, cuando existe interacción entre dos especies bacterianas distintas, este proceso es conocido como “cross-talk”.

El descubrimiento de que las bacterias son capaces de generar moléculas de señalización idénticas, sugirió la idea de que bacterias de distintas especies pueden comunicarse entre sí, este mecanismo se le conoce como cross-talk. Por ejemplo la bacteria luminiscente, *Vibrio harveyi*, produce dos autoinductores. El primero AI-1 es un AHL (véase la figura 2.10) y lo utiliza sólo para la comunicación entre las bacterias *V. harveyi*. El otro IA-2 (véase la figura 2.11), se sintetiza a partir de S-adenosil metionina.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

La enzima que cataliza el paso final en esta síntesis se llama LuxS. El gen de la enzima LuxS se encuentra en muchas bacterias, todas producen y responden a AI-2. Esto hace pensar que tal vez el AI-2 permite que las bacterias capten y reaccionen a no sólo los miembros de su propia especie, sino también a todas las demás especies que producen el AI-2. Cabe imaginar que en entornos complejos, con diferentes mecanismos de quorum sensing, se podría dar una compleja red de quorum sensing para mantener el equilibrio ecológico.

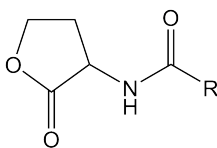


Figura 2.10: N-acyl homoserine lactone - Estructura química general del N-acyl homoserine lactone. Esta imagen se encuentra bajo la licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 3.0.

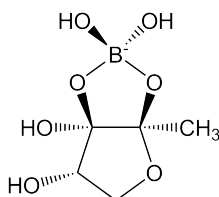


Figura 2.11: Autoinductor-2 - Estructura química de la molécula autoinductora AI-2. Esta imagen se encuentra bajo la licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 3.0.

2.2. Circuitos con comunidades de bacterias

2.2.1. Introducción

A continuación se recogen distintos ejemplos de circuitos con bacterias basados en la conjugación.

Para la resolución de este tipo de problemas se deben considerar las siguientes características:

1. **Cantidad de información:** Para el quorum sensing solamente podemos transmitir un bit, mientras que para la conjugación es mucho mayor (plásmidos).
2. **Medio en donde se encuentran:** Para un medio líquido la conjugación puede ser mucho más complicada, ya que requiere del contacto directo y durante un tiempo determinado, y en este medio la probabilidad de que se cumplan esas condiciones baja mucho. Al contrario que en el quorum sensing, que en un medio líquido funciona mucho mejor, ya que la señal se difunde con mayor facilidad.
3. **Rapidez de transmisión:** El tiempo de propagación del quorum sensing es mucho menor que el de la conjugación. Se realiza más rápido la transferencia de información a través del quorum sensing.
4. **Degradación de la señal:** La degradación de la señal en el quorum sensing requiere de largos periodos de tiempo. Si se necesita probar una condición y volver al estado original sin matar a la célula o cambiar cualquiera de sus características genéticas y fisiológicas, es mucho mejor utilizar la conjugación, ya que resulta más sencillo destruir el plásmido conjugado.

2.2.2. Conjugación bacteriana

Caso 1:

Un caso real de un circuito que utiliza la conjugación bacteriana, es el trabajo realizado por la **universidad de Berkeley en el iGEM de 2006 (Adam P.Arkin & Jay D. Keasling)**. Se plantearon crear una red en el que las células interactúan entre sí, basándose en el aprendizaje neuronal. Desarrollaron un proceso de conjugación selectiva para la comunicación dentro de las red. La bacteria utilizada es la E. coli. Las bacterias se envían mensajes entre sí gracias a la conjugación, pero el mensaje sólo tiene sentido en

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

algunas células que admiten estas secuencias. Estas secuencias se hibridan modificando la conectividad espacial del sistema neuronal. Para construir este sistema, optaron por la conjugación como sistema de comunicación entre las bacterias. La información contenida en los plásmidos transferidos sólo es accesible por las “llaves” de ARN que son capaces de “desbloquearlos”. El proceso de conjugación selectiva se adaptó para la construcción de una red de puertas lógicas NAND en cultivos bacterianos. La finalidad de este circuito bacteriano es demostrar que se pueden crear redes de bacterias con capacidad de aprendizaje.

El trabajo lo dividieron de la siguiente manera:

1. Construcción de riboreguladores de gran eficacia.

Para conseguir un sistema de conjugación selectiva, pusieron a todas las bacterias un “identificador”. Este identificador está codificado en forma de riboregulador de ARN o “cerradura”, y controla la capacidad que tienen las bacterias de comunicarse unas con otras. Entonces es necesario crear riboreguladores de alta eficiencia, que puedan ser modificados fácilmente para poder generar muchos más pares ortogonales llave/cerradura.

El diseño original de los riboreguladores de ARN es de J.J. Collins y sus colaboradores [26]. Se componen de dos secuencias de ARN, una corta “cis-repressed RNA” (crRNA), adopta el papel de cerradura y otra llamada “transactivating RNA” (trRNA), se comporta como llave. La secuencia cerradura es la que controla la expresión del gen, lo hace bloqueando el sitio donde se unen los ribosomas (RBS). Esto resulta gracias a una estructura en horquilla que ocluye el RBS impidiendo así el acceso a los ribosomas. Dentro de la secuencia cerradura, existe la “pyrimidine-uracil-nucleotide-purine” (YUNR). En la secuencia llave se encuentra el complementario de YUNR, cuando interactúan las dos zonas, la horquilla se abre, desbloqueando el RBS y permitiendo la expresión del gen (véase la figura 2.12).

2. Aprovechar el proceso de conjugación bacteriana.

La conjugación bacteriana proporciona el sistema de comunicación en la red. Utilizaron dos plásmidos naturales el RF4 y el F. Al mezclar las bacterias en un

2.2 Circuitos con comunidades de bacterias

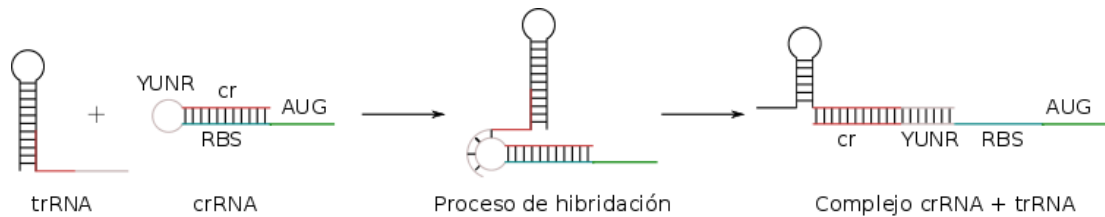


Figura 2.12: Interacción de los riboreguladores - (Izquierda) La hebra crRNA está replegada sobre sí misma, bloqueando la zona RBS, impidiendo la traducción del ARNm en proteína. (Centro) La secuencia trRNA entra en contacto con la zona YUNR de la secuencia crRNA y comienza la hibridación de las dos hebras. (Derecha) Las dos hebras se encuentran totalmente ligadas formando el complejo trRNA + crRNA. La zona RBS se encuentra libre, permitiendo que el ribosoma se una y comience la traducción de la proteína. Obtenido con permiso de: [26] “Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression”, Isaacs et al., Nature, y año 2004.

medio líquido o en una placa de agar, los “mensajes” de ADN se van a transmitir de una célula donadora a otra receptora gracias a la conjugación, así sucesivamente, propagando la señal. Los plásmidos que contienen la maquinaria de conjugación, son grandes del orden de 60-100 kb. Estos plásmidos codifican toda la información necesaria para que se lleve a cabo la conjugación, incluyendo la formación de los pili y previniendo futuras conjugaciones innecesarias, bloqueando la membrana. Este bloqueo se produce entre células con un mismo tipo de plásmido, permitiéndose la conjugación entre células con distintos tipos de plásmido. Así, una célula con un plásmido de tipo F se puede conjugar con otra cuyo plásmido es de tipo R y viceversa. Un componente necesario para que se lleve a cabo la conjugación, es el origen de transferencia (*oriT*). Esta secuencia indica el lugar de corte para iniciar la transferencia del plásmido. Si se suprime el *oriT* del plásmido conjugativo no se transfiere nada a la bacteria receptora. Gracias a los métodos de Wagner [27] para quitar el *oriT* del plásmido conjugativo, lo suprimieron del plásmido conjugativo F o del RP4, dependiendo del caso, insertándolo a un plásmido pequeño llamado “mensaje”. De esta manera, cuando la bacteria donadora se conjuga, transmitirá este plásmido mensaje y no el conjugativo. El plásmido mensaje además de la región *oriT*, va a tener la secuencia de la llave. Permitiendo a la célula receptora, que contiene la secuencia cerradura complementaria del par riboregulador, expresar sus genes (véase la figura 2.13).

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

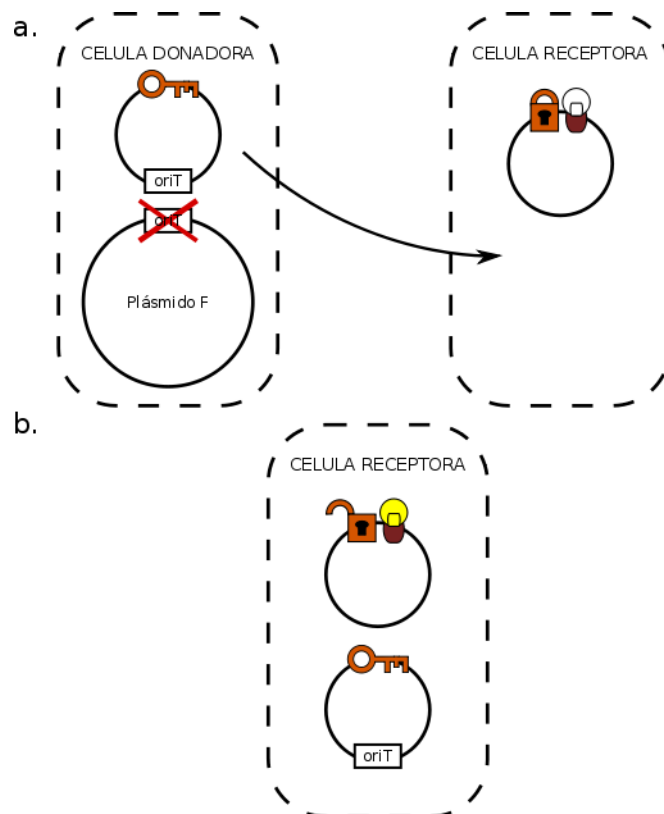


Figura 2.13: Proceso de conjugación - **a.** Antes de conjugarse. La bacteria de la izquierda, es la bacteria donadora. Contiene dos plásmidos, uno el plásmido F que incluye todos los elementos necesarios para realizar la conjugación, excepto la secuencia *oriT*, y otro el plásmido mensaje que contiene la secuencia llave y la secuencia *oriT*. La bacteria de la derecha, es la bacteria receptora. Contiene un plásmido, que contiene la secuencia cerradura y un gen que expresa una proteína de fluorescencia. **b.** Después de conjugarse. La bacteria receptora, tiene un plásmido más. El plásmido transferido por la bacteria donadora. Si en este plásmido la llave es complementaria a la cerradura, se expresará el gen que contiene la proteína de fluorescencia. Obtenido con permiso de: Universidad de Berkeley, IGEM, y año 2006.

La red debe tener la capacidad de mantener, enviar y recibir plásmidos cada vez que una célula receptora encuentre una secuencia llave complementaria. De esta manera, cada vez que una célula recibe una llave que coincide, se activa y responde enviando un mensaje.

La posibilidad de **enviar mensajes** está relacionado con componentes críticos en la maquinaria de transferencia. El gen *traG* del sistema F y el gen *trbC* del sistema R, son genes críticos para la transferencia, ya que están implicados en la formación de la estructura del pilus. Cuando suprimieron estos genes y observaron que a pesar de contener *oriT*, no existía transferencia alguna.

La capacidad de **mantener un mensaje vivo**, debe de estar bajo control. Dentro de la red, las células reciben constantemente mensajes, y estos plásmidos se mantendrán a lo largo del tiempo, siempre que se les permita replicarse. Utilizaron el sistema de replicación del plásmido R6K, que es de tipo IncX. La replicación se controla por el producto proteico del gen *pir*. Esta proteína conocida como π se une a los orígenes de replicación *ori* bloqueándola. Con bajas concentraciones de π aumenta la replicación o número de copias y con altas disminuye. El número de copias de un plásmido natural de tipo R6K en una bacteria suele ser del orden de 15 a 30 [28].

Por último, también se tiene que controlar la capacidad de **recibir mensajes**. Existen varios genes, entre ellos *dnaB*, que reducen la eficiencia del bloqueo de la membrana o “surface exclusion” [29].

Para controlar la expresión de todos los genes que gestionan el envío, el mantenimiento y la recepción del plásmido, se les inserta una secuencia de bloqueo o cerradura (véase la figura 2.14).

3. Demostrar la capacidad de computar.

Una aplicación de la conjugación selectiva es la capacidad de computar. En este experimento, cada célula es un interruptor, puede estar encendida o apagada, y cada trio de células puede formar una puerta lógica. Los investigadores desarrollaron puertas lógicas NAND. En este diseño, las entradas de la puerta son el par de riboreguladores que controlan la transferencia de salida. Cuando los riboreg-

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

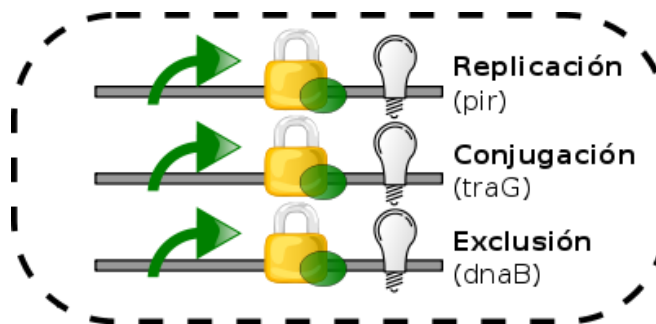


Figura 2.14: Esquema de bacteria - La bacteria tiene bloqueados los genes, que le dan la capacidad de enviar, mantener y recibir plásmidos. La expresión de los genes se activa cuando la célula recibe su llave complementaria, permitiendo replicar el plásmido recibido y mandárselo a otras bacterias. Obtenido con permiso de: Universidad de Berkeley, IGEM, y año 2006.

uladores son complementarios, se expresa el gen *lacI*, bloqueando el sistema de envío (vease el siguiente esquema 2.15).

4. Construir una red de aprendizaje bacteriana.

Para la construcción de la red, lo primero es el diseño de una población de bacterias con un sistema de comunicación unidireccional. Cada nodo va a contener una llave bloqueada, permitiéndose la propagación sólo cuando una célula donadora desbloquea la llave de la célula receptora. Este control, como se ha visto anteriormente, lo realiza un sistema de bloqueos con riboreguladores. A los riboreguladores se les puede considerar como la conectividad física existente en las neuronas (dendrita-axón) en el sistema nervioso.

Cada nodo de la red está compuesto por varias bacterias (véase la figura 2.16).

En la red, todas las bacterias son similares genéticamente a excepción de sus secuencias bloqueantes, en la que cada una tendrá la suya particular. La distribución de los bloqueos va a estar restringida por capas dentro de la red. Con lo que, la capa 1 sólo contiene llaves que corresponden a las cerraduras de la capa 2. La capa 2 puede abrir las cerraduras de la capa 3, y así sucesivamente. Dentro de la capa $n + 1$, cada bacteria contiene una cerradura que hace juego con una llave presente en una bacteria de la capa n (véase la figura 2.17).

Al principio de la red, en la parte superior de las capas, hay un conjunto de

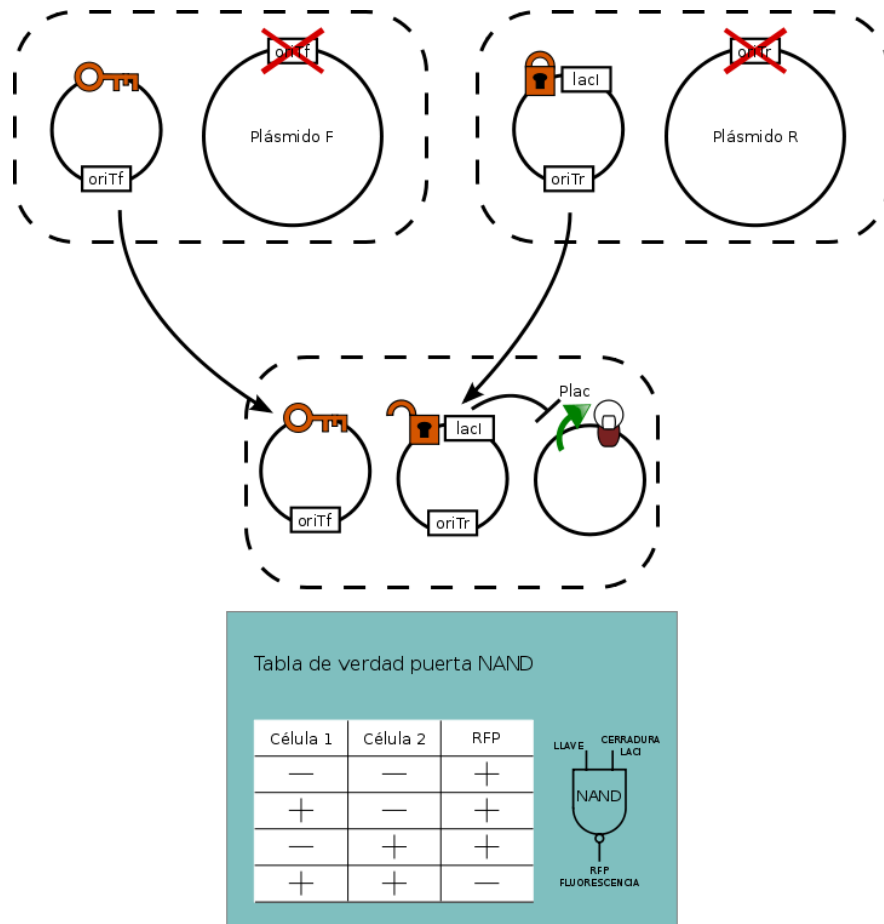


Figura 2.15: Diseño puerta NAND - Las bacterias superiores envían dos plásmidos a la bacteria inferior. Los plásmidos tienen un sistema de riboreguladores que controlan la expresión del plásmido de salida. Cuando el riboregulador que controla la expresión del gen *lacI* se libera, permite que se bloquee el promotor *Plac*, no permitiendo la transcripción de la proteína de fluorescencia RFP. La tabla de abajo, es la tabla de verdad de la puerta NAND resultante. Obtenido con permiso de: Universidad de Berkeley, IGEM, y año 2006.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

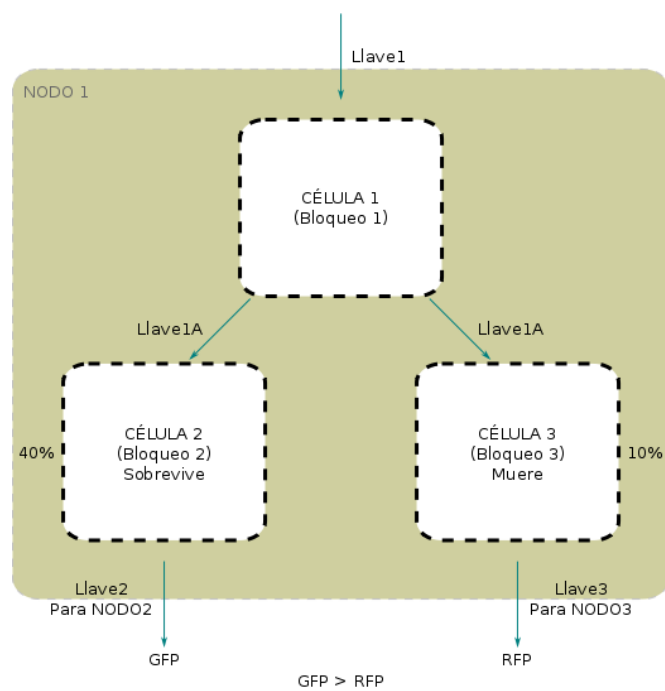


Figura 2.16: Nodo de la red - Cada nodo de la red está formado por varias bacterias, la bacteria superior es la que recibe la señal de entrada, propagando la señal a las inferiores. Obtenido con permiso de: Universidad de Berkeley, IGEN, y año 2006.

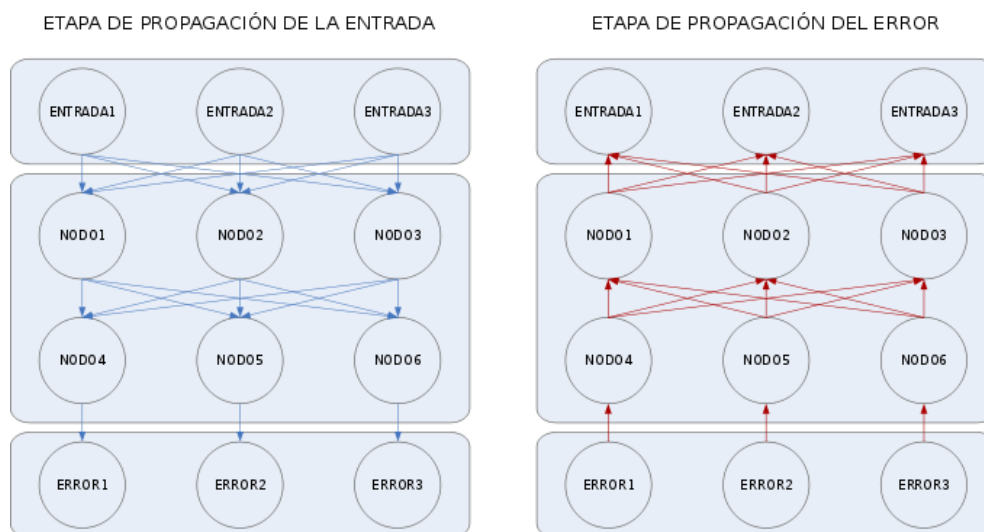


Figura 2.17: Esquema de la red de bacterias - La red esta distribuida en filas, cada fila tiene la capacidad de propagar la señal a la fila inmediatamente posterior o anterior a ella, dependiendo de la fase. La capa superior o de entrada propaga la señal positiva en función del conjunto de llaves de entrada, y la capa inferior o de error propaga la señal negativa, en sentido contrario. Obtenido con permiso de: Universidad de Berkeley, IGEM, y año 2006.

bacterias de entrenamiento que propagan una señal que marca de manera positiva a todas aquellas bacterias que respondan a su llave. Por lo tanto la entrada de este sistema de entrenamiento es un conjunto de llaves.

Al final de la red, en la parte inferior de las capas, existe un conjunto de bacterias de error que propagan una señal que marca de manera negativa. Todas las bacterias capaces de recibir esta señal negativa mueren.

Con la combinación de las señales positivas y negativas, la red aprenderá y será capaz de dar una respuesta a un patrón de llaves de entrada.

La universidad de Berkeley en el IGEM del 2006, no pudo ejecutar este último apartado experimentalmente.

5. Conclusión

Consiguieron ejecutar empíricamente las tres primeras partes del proyecto. Dejando la construcción de la red de aprendizaje con bacterias diseñada, faltando su ejecución experimental.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Caso 2:

Otro ejemplo de circuito con conjugación bacteriana, es el proyecto presentado por la **universidad de Delf en el IGEM de 2009**. Ellos plantearon crear un sistema de comunicación célula a célula que permite la propagación de un mensaje con capacidad para ser reseteado. Para lograrlo, dividieron el experimento en tres módulos. El primero, incluía un sistema de conjugación rediseñado para su propósito. El segundo, es la creación de un dispositivo para generar demoras en el tiempo de propagación de la señal. Y el último, destruye el plásmido transmitido. Solamente se describirá el primer módulo, el concerniente a la conjugación. Este sistema, por ejemplo, podría ser la base para la creación de un biosensor de larga distancia y/o ser aplicado para reducir la resistencia a los antibióticos de las bacterias.

El sistema conjugativo, está compuesto por dos plásmidos. Uno, el plásmido que llaman ayudante, este es el que permite realizar la conjugación, y lo van a tener todas las bacterias. Otro, denominado plásmido señal, es el que se va transferir de una célula a otra. Para evitar problemas con un mecanismo conocido como “entry exclusion” o “surface exclusion” (proteínas en la membrana envolvente que impiden la conjugación entre dos células que contienen el mismo plásmido [30]), lo que hacen es modificar el plásmido ayudante realizando una conjunto de disecciones o “knockouts”.

Para su estudio seleccionaron el plásmido de conjugación R751/IncP-beta por las siguientes razones:

1. El plásmido-F tiene dos proteínas que manejan el surface exclusion (TraT, TraS), mientras que el IncP sólo tiene una (TrbK) [31].
2. El plásmido-F tiene un sistema de inhibición de la fertilidad, mientras que el plásmido R751 no tienen dicho sistema [31].
3. Es de un tamaño pequeño, comparado con otros plásmidos:
 - R751 es 53423 pb
 - RP4 es 60099 pb
 - F es 99159 pb
4. Y el oriT del plásmido R751 tiene su propio “biobrick”, definido en el IGEM de 2007 por la universidad de Pekín cuyo identificador es BBa_I714031.

Realizaron una serie de modificaciones en los plásmidos para evitar los siguientes problemas:

1. **Entry exclusion:**

Al igual que en la naturaleza, observaron que la conjugación ocurre muy pocas veces, esto es debido a la presencia de proteínas que activan la maquinaria que produce la entry exclusion. Estas proteínas de membrana bloquean las transferencias entrantes. Con esto se observa que para que la transferencia sea bloqueada su presencia es necesaria sólo en el receptor. Estas proteínas existen por dos razones principales:

- a) Para evitar la transferencia redundante del plásmido conjugativo entre las células de la población.
- b) Para evitar la zigosis letal.

Existen algunos documentos que afirman, que la presencia de las proteínas de exclusión, no son necesarias para que la conjugación se produzca [32], y que su eliminación no influye en la frecuencia de conjugación [33].

Sabiendo todo esto, lo que decidieron hacer es un knockout del gen *trbK* en el plásmido R751 o ayudante, y añadieron este gen al plásmido señal, para evitar que la señal se propague hacia atrás.

2. **Prevención de la transmisión del plásmido ayudante:**

En el experimento lo que quieren es transmitir el plásmido señal de una bacteria a otra y no el plásmido ayudante o conjugativo. Los métodos para lograrlo han sido previamente demostrados en el iGEM por los equipos de Berkeley '06 y Pekín '07. Lo consiguieron eliminando el origen de transferencia *oriT* del plásmido R751 y se lo añadieron al plásmido señal.

3. **Prevención de la zigosis letal:**

¿Qué es la zigosis letal? Se trata de un problema causado por las células cuando se conjugan demasiadas veces, ya que provocan daños en la membrana y se puede producir incluso a la muerte [34].

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Ante la pérdida del gen de exclusión las células se exponen a la zigosis letal. Por eso modificaron la maquinaria de conjugación del plásmido ayudante, haciendo otro knockout de un gen básico y necesario para que la conjugación tenga éxito. Este gen lo incluyeron al plásmido señal, asegurándose de esta manera, que cuando una bacteria se conjuga, recibe el plásmido señal o señal que se quiere difundir. Seleccionaron el gen *trbC* porque es pequeño y codifica subunidades del pilin necesarias en la formación de la estructura del pilus.

En el siguiente capítulo se muestra como modelizaron la conjugación.

Lo que han conseguido empíricamente es transmitir un plásmido de una célula a otra. Aunque no pudieron lograr hacer los knockouts en el plásmido conjugativo, si que modificaron con éxito el plásmido señal, y demostraron el experimento con cepas R751 salvajes. Otra demostración exitosa, fue la que hicieron sobre la síntesis y caracterización de la proteína de bloqueo *trbK*. Comprobaron que era capaz de bloquear las transferencias del plásmido R751 a células receptoras.

2.3. Modelos para simular un sistema bacteriano

2.3.1. Introducción

Los sistemas bacterianos se basan fundamentalmente en procesos que como tales sólo pueden ser analizados mediante modelos o procesos. Se entienden por modelos, las representaciones de procesos dinámicos en el tiempo que se presuponen relevantes para explicar los patrones observados.

Muchas veces, los modelos estadísticos, la experimentación y el contraste de hipótesis, son insuficientes para poder comprender los mecanismos que se observan en la naturaleza. La construcción de modelos es esencial para el análisis y la comprensión de la emergencia de estos comportamientos. En particular, los modelos son un elemento esencial del método hipotético-deductivo que nos permite evaluar las consecuencias lógicas de determinados principios generales o mecanismos subyacentes. La comparación entre estas “consecuencias” y la realidad sirve para apoyar o refutar la validez de estos principios y teorías [35].

Este apartado clasifica los distintos modelos que se pueden utilizar. La clasificación la realiza fijándose en la continuidad de las variables. Y luego, se centrará en explicar ejemplos concretos de formas de modelizar la conjugación. Dependiendo de las necesidades del observador se utilizará un modelo u otro.

2.3.2. Clasificación de los distintos modelos según la continuidad de sus variables

Para una mejor comprensión de la clasificación, primero se explican los siguientes conceptos:

- **Modelo espacialmente explícito** es aquel en el que alguna de sus variables de estado depende del espacio. Por ejemplo los modelos de vecindad.
- **Modelo de campo medio o “mean field”** se dice de él que sus procesos de interacción son globales. La probabilidad de interacción entre individuos es independiente de su posición espacial. Las ecuaciones de Lokta-Volterra.
- **Espacio continuo** o hábitat “vectorial”. Lo resuelven modelos de difusión.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

- **Espacio discreto** o hábitat definido como un “raster” mediante celdas o casillas. Se puede modelizar con autómatas celulares.
- **Modelos analíticos** son los que se rigen por una expresión matemática para describir el estado temporal del sistema. Son los modelos de crecimiento exponencial de una población, ver apartado 2.3.3.
- **Modelo de simulación** son aquellos en los que no existe una expresión matemática sino un conjunto de reglas o programa informático. Simuladores informáticos.

La siguiente tabla 2.2 muestra el modelo a utilizar, dependiendo de si las variables son continuas o discretas.

2.3.3. Modelo clásico de crecimiento exponencial

Como se vio en el capítulo anterior, la universidad de Delf en el IGEM de 2009, realizó un experimento en el que utilizaba la conjugación bacteriana, como herramienta para difundir una señal. Además del conocimiento empírico, también modelizaron el experimento.

El modelo de conjugación que siguieron se basó en el expuesto en el documento “A model for bacterial conjugal gene transfer on solid surfaces” [6], y que lo modificaron para simular su experimento. Este consiste en células con el plásmido R751, conjugando sobre una placa con agar y un filtro de $0.2\ \mu\text{m}$, durante una hora.

Las suposiciones con las que trabajaron, son las siguientes:

- La distribución inicial de las células es aleatoria.
- Los tiempos necesarios para realizar la conjugación son menores que los necesarios para agotar los nutrientes.
- Un conjunto de células forman una colonia (conocido en microbiología como una “colony-forming unit” o CFU).
- Todas las células, independientemente de su tipo, tienen las mismas tasas de crecimiento.
- La conjugación se produce en el instante en que la colonia donadora toca a la receptora, sin ningún tipo de retardo para efectuarse la conjugación.

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

| Características | Metodologías no-espaciales | Modelos espacialmente explícitos |
|--|--|---|
| Espacio, tiempo y estados continuos | Sistemas de ecuaciones diferenciales. | Interacción espacial desacoplada de la dinámica. Cuadrículas de EDOs con términos difusivos. Interacción espacial del mismo orden que la dinámica. PDE, ecuaciones diferenciales parciales. |
| Espacio y tiempo discretos, estados continuos. | Sistemas de ecuaciones en diferencias (mapas). | Mallas de mapas acoplados (“Couple map lattices”). |
| Espacio, tiempo y estados discretos. Interacciones deterministas. | — | Autómatas celulares (deterministas): interacciones locales. |
| Espacio y estados discretos. Tiempo discreto o continuo. Interacciones estocásticas. | Procesos estocásticos. | Sistemas de partículas interactivos o sistemas estocásticos espaciales. Muy difíciles de tratar analíticamente. <ul style="list-style-type: none"> ■ Modelos de ocupación de celdas (“patch occupancy”). Autómatas celulares estocásticos. ■ Modelos basados en individuos (MBI). |

Tabla 2.2: Clasificación de los modelos según la continuidad de sus variables.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

- No se tiene en cuenta la pérdida del plásmido.
- Las células no pueden moverse por la superficie, sólo existe una expansión de la colonia.

Los parámetros con los que trabajaron son los siguientes:

- Área media (A).
- Radio de la colonia inicial (r_0).
- Tasa de crecimiento específica (g_n).
- Tasa de crecimiento radial de la colonia (g_r).
- Número máximo de células soportadas por el sistema (N_{max}).
- Número inicial de células donadoras (N_d) y receptoras (N_r).

Inicialmente, las bacterias se colocan siguiendo una distribución de Poisson homogénea. Este modelo distribuye de manera aleatoria puntos sobre una superficie plana. Bajo este modelo, el número de bacterias en una región A , con una superficie $|A|$, es una distribución de Poisson de parámetro $\lambda|A|$, donde λ es la intensidad (bacterias por unidad de superficie). Entonces podemos ver [36] que la distancia a la célula más cercana (r) tiene la función de distribución:

$$F(r) = 1 - e^{-\lambda r^2}$$

El crecimiento de las bacterias en el modelo de C. Lagido y sus colaboradores [6], aumenta de manera exponencial. Sin embargo, ellos decidieron que el crecimiento fuera lineal, así el radio en el instante t es:

$$r(t) = r_0 + g_r t$$

Dos colonias de radio r , se pondrán en contacto en el momento en que la distancia entre los centros sea menor que $2r$, en ese mismo momento, gracias a un proceso iterativo, las células receptoras pasan a ser transconjugantes.

Realizaron un gran número de simulaciones para diferentes valores de los parámetros. Para valores altos de λ se producen más transconjugantes en menos tiempo, ya que las colonias se encuentran más próximas. Para valores elevados de g_r también se crean más transconjugantes, en este caso porque las colonias entran en contacto más deprisa. Debido a que asumen que la conjugación es instantánea, este modelo tiende a

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

sobrestimar la conjugación. Esta sobrestimación es menor para pequeñas intensidades (λ).

La influencia de ambos parámetros g_r y λ en el crecimiento del número de transconjugantes, se pueden ver en los siguientes resultados: figura 2.18 y figura 2.19.

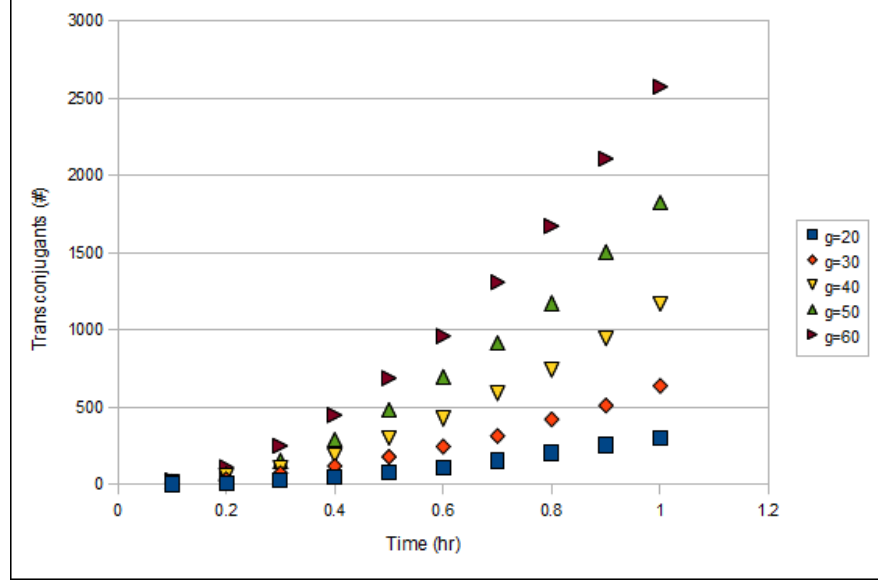


Figura 2.18: Gráfico de g_r con respecto al tiempo: - Muestra el número de transconjugantes como función del tiempo cuando varía el valor de g_r . Obtenido con permiso de: Gráfica GR, universidad de Delf, iGEM, y año 2009.

Finalmente muestran la eficiencia conjugativa. Este cálculo supone que todas las colonias se crearán con igual CFU cuando el filtro de conjugación es restaurado y emplatado. Los gráficos 2.20 y 2.21, muestran como la eficiencia se ve afectada por los parámetros g_r y λ .

2.3.4. “Interactive Particules Systems” o IPS

Los “Interactive Particules Systems” o IPS, son sistemas que permiten modelizar espacios discretos. Ayudan a estudiar de manera más realista los posibles mecanismos que generan la distribución de los individuos partícipes en el sistema, e incorporar procesos como, la competencia o la dispersión, que pueden tener una gran influencia en el estudio de sistemas bacterianos [35].

Estos modelos son ideales para la investigación de interacciones localizadas que se

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

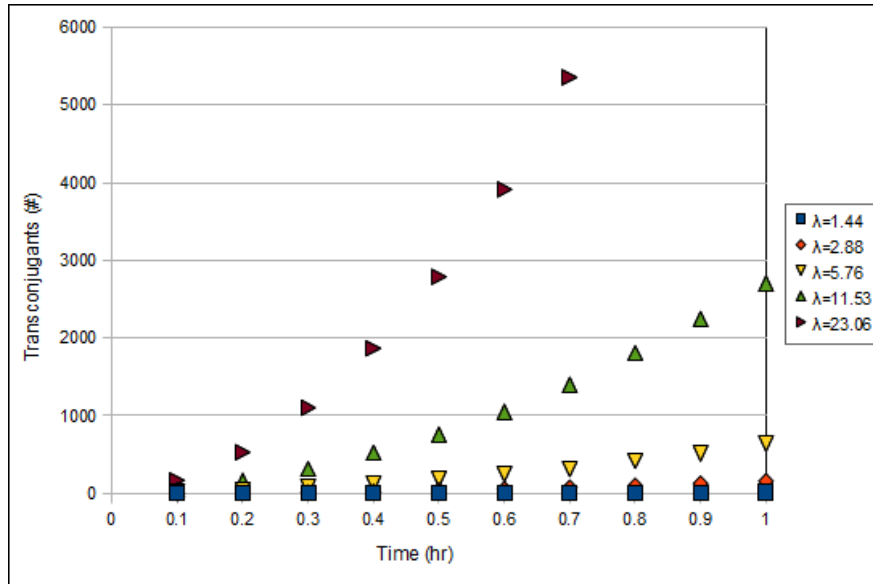


Figura 2.19: Gráfico de λ con respecto al tiempo: - Muestra el número de transconjugantes como función del tiempo cuando varía el valor de λ . Obtenido con permiso de: Gráfica LAMBDA, universidad de Delf, iGEM, y año 2009.

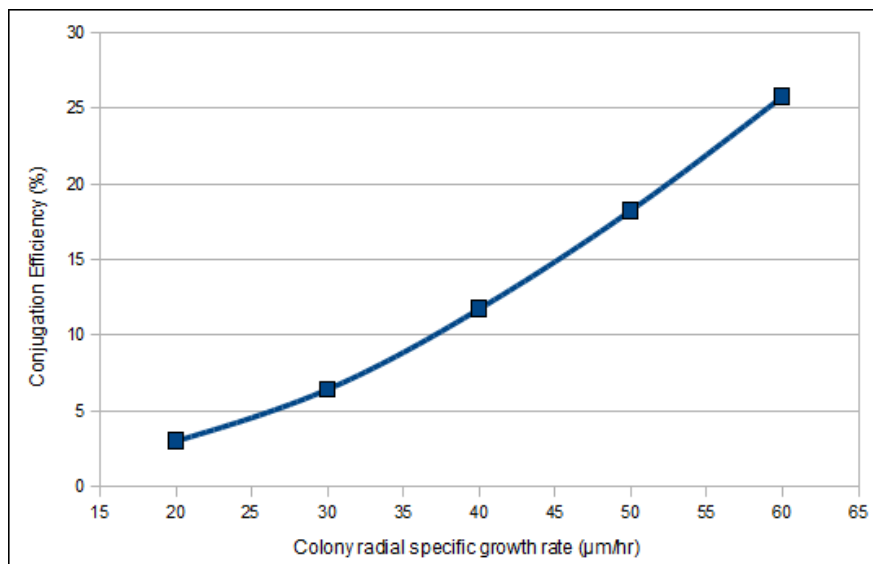


Figura 2.20: Gráfico de eficiencia conjugativa 1: - Muestra la eficiencia conjugativa con respecto a g_r . Obtenido con permiso de: Eficiencia conjugativa GR, universidad de Delf, iGEM, y año 2009.

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

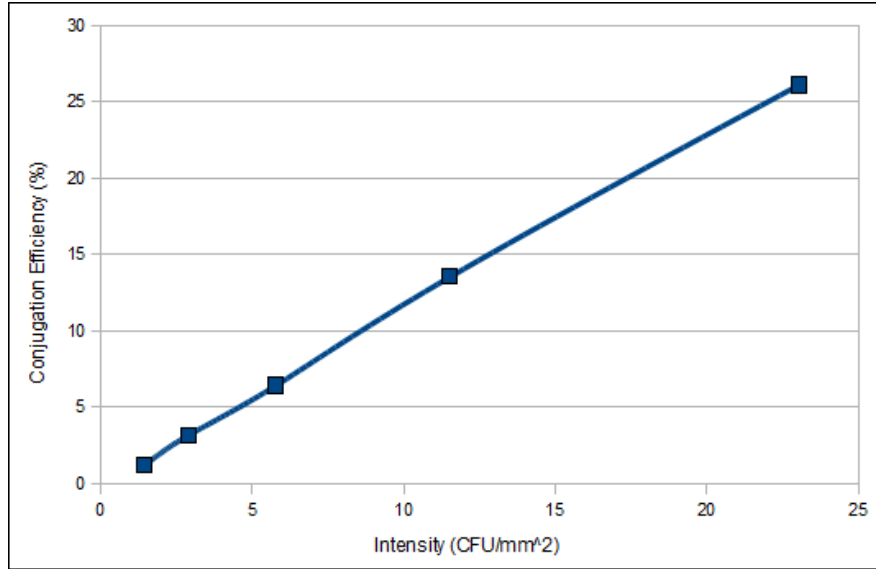


Figura 2.21: Gráfico de eficiencia conjugativa 2: - Muestra la eficiencia conjugativa con respecto a λ . Obtenido con permiso de: Eficiencia conjugativa LAMBDA, universidad de Delf, iGEM, y año 2009.

producen en las comunidades microbianas naturales y ofreciendo una visión microscópica de esa comunidad hasta un nivel de células individuales.

En los modelos clásicos, como el modelo de crecimiento exponencial [6], logístico o las ecuaciones de Lotka-Volterra para describir la dinámica depredador-presa, es frecuente asumir que todos los individuos de la población interactúan con la misma probabilidad independientemente de la abundancia, frecuencia o posición espacial de los individuos. Esta asunción puede estar más o menos justificada para casos concretos, pero es del todo injustificable en poblaciones en donde tanto los procesos de competencia como de cooperación tienen lugar en un radio de interacción limitado (como por ejemplo: la conjugación y el quorum sensing). Los modelos espaciales han sido determinantes para comprender el papel de los procesos locales en la organización espacio-temporal de las poblaciones en sistemas biológicos [37], [38], incluyendo algunos que involucran a las comunidades microbianas [39], [5], [40], [41], [42].

Existen varios tipos de modelos IPS y se distinguen normalmente por el grado de definición, diferenciando entre modelos para individuos, poblaciones o comunidades. Por ejemplo, los modelos basados en individuos (MBI) y los autómatas celulares estocásticos son similares salvo por la interpretación dada a los individuos y por las reglas de

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

interacción entre ellos. Los autómatas celulares se concentran en patrones geométricos globales derivados de las interacciones locales, mientras que los MBI, se fijan en la diversidad individual y cómo esta afecta al comportamiento colectivo. Recientemente, varias publicaciones han revisado críticamente la contribución de los MBI, a la biología teórica y la ecología [[43]-[44]].

El documento “*Modelling the spatial dynamics of plasmid transfer and persistence*” [7] que se describe a continuación, constituye un buen ejemplo de los IPS. Desarrollaron un modelo IPS que proporciona un marco predictivo para la caracterización de la transferencia de un plásmido y la persistencia en poblaciones bacterianas espacialmente estructuradas.

El modelo consiste en, una malla de un tamaño 500x500 o 1000x1000, con bordes periódicos y en el que cada posición puede contener nutrientes, bacterias o ambos a la vez. Bordes periódicos se refiere a, que el borde de arriba coincide con el de abajo y el de la izquierda coincide con el de la derecha (estilo comecocos). Cada posición equivale al tamaño de una bacteria aproximadamente 1 o 2 μm , con lo que la malla será de unos pocos milímetros.

Hay tres tipos de bacterias, las donadoras D , las receptoras R , y las transconjugantes T . Los nutrientes se denotan con C .

Como las bacterias no se pueden quedar en el suelo por falta de espacio, se apilan entre ellas generando estructuras en 3D. Este modelo hace una simplificación al respecto, permitiendo en su organización en 2D, que cada posición pueda tener dos bacterias a la vez. Esta simplificación no ralentiza la simulación excesivamente, lo que si hace una simulación completa en 3D. Se asume que la distribución de los nutrientes es una por posición. Esta restricción no es tan severa como puede parecer, si tenemos en cuenta que cada célula puede consumir nutrientes en una vecindad muy grande.

Una posición puede estar vacía, contener un nutriente, contener una célula o dos, o todo a la vez. Las células pueden ser de tipo (D , R y T) y dos células que se encuentran en una misma posición no tienen por qué ser del mismo tipo. Como es un modelo en 2D, no se diferencia entre la célula que está arriba o abajo. El consumo de nutrientes constituye una condición sin la cual no se da la reproducción. La conjugación sin embargo no gasta nutrientes, aunque sus velocidades pueden depender de las concentraciones de ellos.

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

Existen dos tipos de vecindad, la vecindad local y la vecindad de los nutrientes. La vecindad local, especifica las posiciones en donde se puede conjugar la célula y donde pueden situarse las células hijas en la reproducción. La vecindad de los nutrientes, determina la cantidad de nutrientes accesibles desde esa posición. La vecindad de los nutrientes es mayor que la local para poder representar la difusión del nutriente. El tamaño de la vecindad local dado una posición x es de 3×3 , donde x es el centro, abarcando 9 posiciones. La vecindad de nutrientes de una posición x es 7×7 , donde x es el centro, estando formada por 49 posiciones (véase la figura 2.22).

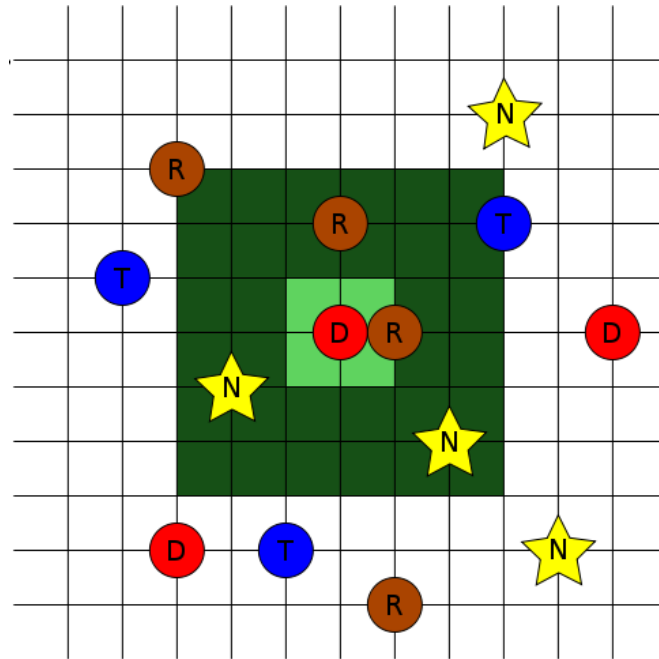


Figura 2.22: Estructura de la malla para el modelo IPS - Los círculos representan bacterias de diferentes tipos según su color. Las 9 posiciones pintadas de verde claro representan la vecindad local de una posición central, y las 49 posiciones pintadas de verde oscuro y claro la vecindad de los nutrientes de dicha posición. Obtenido con permiso de: [7] modelo IPS, S.Krone et al., Microbiology, y año 2007.

Todas las tasas dependen de los nutrientes mediante una función quasi-sigmoideal $\psi(C)$ o índice de crecimiento. Está definida de la siguiente manera 2.1. Un ejemplo de

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

función $\psi(C)$ se puede observar en la gráfica 2.23.

$$\psi(C) = \begin{cases} \psi_{max} & \text{si } C > \theta_2 \\ \frac{\psi_{max}}{\theta_2 - \theta_1}(C - \theta_1) & \text{si } \theta_1 < C < \theta_2 \text{ y } \psi_{min} = 0 \\ 0 & \text{si } C < \theta_1 \end{cases} \quad (2.1)$$

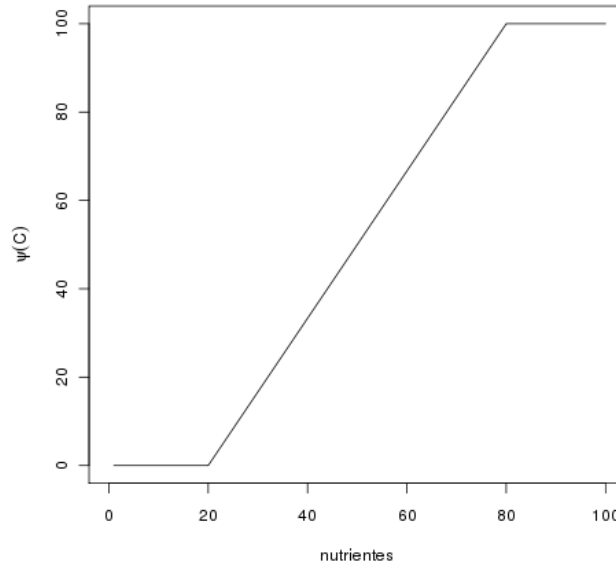


Figura 2.23: Ejemplo de la función $\psi(C)$ - Gráfica ejemplo de la función $\psi(C)$

Los parámetros de la función son los umbrales o fronteras del número de nutrientes.

- Umbral mínimo para el nivel de nutrientes (θ_1).
- Umbral máximo para el nivel de nutrientes (θ_2).

Reproducción: Todas las células pueden dividirse. Su índice de reproducción depende de la cantidad de nutrientes que hay en su vecindad de nutrientes. La célula hija se ubica, de manera aleatoria, en cualquier posición disponible de su vecindad local. Una posición se encuentra disponible, cuando sobre ella hay menos de dos bacterias. En el caso de que no haya posiciones libres, la bacteria no puede reproducirse, con lo que no hay consumo de nutrientes.

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

Para una posición, se define su tasa de crecimiento $\psi(x, C)$, como la función sigmoïdal, en donde C de x , es el número de nutrientes en la vecindad de los nutrientes de ese lugar. Teniendo en cuenta, que los índices de crecimiento pueden ser diferentes dependiendo del tipo de bacteria, se les asociará un subíndice para distinguirlos.

Si una posición x contiene $n_R(x)$ células receptoras, $n_D(x)$ células donadoras y $n_T(x)$ células transconjugante (sabiendo que $n_R(x) + n_D(x) + n_T(x) \leq 2$), entonces se deduce que la tasa de reproducción de ese lugar es $n_R(x)\psi_R(x, C) + n_D(x)\psi_D(x, C) + n_T(x)\psi_T(x, C)$, con una probabilidad de que ocurra, proporcional a todas sus tasas.

Perdida del plásmido: Cuando una célula se reproduce y contiene el plásmido conjugativo, tienen una probabilidad de transmitírselo a sus sucesoras (transmisión vertical del plásmido). La probabilidad de que la hija de una célula T o D siga siendo del mismo tipo que su progenitora es $1 - \tau$ y de que sea de tipo R es τ . No se tiene en cuenta el número de copias del plásmido en el proceso de conjugación, sólo se diferencia entre bacterias con maquinaria de conjugación y las que no la tienen.

Conjugación: La conjugación lógicamente sólo la pueden efectuar las bacterias de tipo D y T , con unas tasas de conjugación $\gamma_D(C)$ y $\gamma_T(C)$, estas funciones se calculan igual que las tasas de reproducción. Así, una bacteria receptora x se convierte en transconjugante con una tasa igual a $\gamma_D(x, C)n_D(x) + \gamma_T(x, C)n_T(x)$.

Represión: Hay algunos plásmidos, que tienen un mecanismo de control negativo de su transferencia. Sólo se transfieren durante unas pocas generaciones. El resto del tiempo, los genes encargados de la conjugación están reprimidos. Este sistema asegura la rápida dispersión epidémica de los plásmidos. La represión de la transferencia se produce, coincidiendo con la situación en la que el plásmido conjugativo ha “invadido” toda o casi toda la población. Ahorrándose la energía y materiales que tendría que dedicar a fabricar pelos sexuales y demás funciones conjugativas, en unas condiciones en las que serían superfluos. Además ayuda a prevenir el ataque de fagos que reconocen los pili utilizados en la conjugación.

Para modelizar la represión se utilizan dos tasas de crecimiento $\psi_T(C) < \psi_T^*(C)$, una para las bacterias transconjugantes inhibidas y otra para las desinhibidas, respectivamente, donde las T^* se refiere a las células transconjugantes desinhibidas.

Las células que acaban de conjugarse, se mantendrán desinhibidas durante un tiempo, y tendrán una tasa de conjugación γ_T ; con una tasa ρ . Cuando pierde la capacidad de conjugarse cambia su tasa de conjugación a un valor mucho menor γ_T^* . La tasa de

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

inhibición puede considerarse constante y que depende de la edad de la célula transconjugante. En el caso de que existan plásmidos con algún mecanismo de represión, todas las donadoras y transconjugantes emergentes de la transferencia vertical tendrán inhibida la conjugación [45].

Tiempo: El tiempo se mide por pasos, en cada paso se selecciona una posición y se actualiza según todas las tasas vistas con anterioridad, siempre que esta pueda actualizarse. Para representar el tiempo de simulación consideraron, que el tiempo real de duplicación de una bacteria receptora a 30°C con nutrientes ilimitados es de 40 minutos.

Difusión del nutriente: Para emular la difusión del nutriente, la bacteria que se reproduce sigue el siguiente algoritmo:

1. Si la posición de la célula hija contiene nutrientes este es el que se quita.
2. Si no contiene nutriente, cogerá una posición al azar de la primera vecindad. (las ocho posiciones que se encuentran adyacentes a ese lugar).
3. Si no contiene nutriente, cogerá una posición al azar de la segunda vecindad. (las posiciones que se encuentran a distancia 2 dentro de la vecindad de los nutrientes de ese lugar).
4. Si no contiene nutriente, cogerá una posición al azar de la tercera vecindad. (las posiciones que se encuentran a distancia 3 dentro de la vecindad de los nutrientes de ese lugar).
5. Si no contiene nutriente, se vuelve al paso 2, hasta encontrar un nutriente.

Con este algoritmo observamos que consumir nutrientes más cercanos tiene mucha mayor probabilidad.

Este enfoque para la difusión de nutrientes no es tan sofisticado como los que se utilizan sobre simulaciones en biofilms (véase [40]; [46]), pero tiene la ventaja de ser menos costoso computacionalmente, con lo que se pueden hacer simulaciones a gran escala con mallas muy grandes y observar por ejemplo, estructuras fractales. Hay estudios en los que se han observado estructuras fractales en colonias de bacterias durante el crecimiento extendido en una placa de agar LB [47].

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

Posteriormente el mismo grupo hizo otro estudio en el que cambian algunos aspectos del modelo anterior. El documento “*Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations*” [8], explica el nuevo modelo que se ve a continuación.

Una de las carencias del modelo anterior, es que desarrolla su acción sobre dos dimensiones, aunque en cada celda de la malla se puedan apilar tres elementos. Esta carencia produce, que experimentalmente no coincidan los resultados al cabo de 5 horas, quitando la validez del modelo, pasado ese periodo de tiempo. Este modelo tampoco muestra el gradiente completo de los nutrientes en tres dimensiones. Este sólo distingue entre las células que tienen acceso a los nutrientes y las células que no. Esta simplificación es suficiente para captar los principales efectos de los nutrientes y de la estructura espacial de los experimentos. Haciendo coincidir las observaciones empíricas. Afirman que diseños de biofilms más complejos en 3D, que modelan con mucho más detalle la difusión del nutriente, predicen los mismos resultados.

El modelo está construido sobre una malla cuadrada en 2D, pero tiene algunos aspectos de estructura 3D. Distingue a las bacterias en dos niveles (las superiores y las inferiores). Designa un intervalo de tiempo $[0, L]$ justo después de cada transferencia de la población a un medio fresco, durante el cual, los nutrientes están disponibles para todas las células del fondo. Las etiquetas superior e inferior, que se ponen a las bacterias, se utilizan para mencionar que las células inferiores tienen acceso a los nutrientes, mientras que las de superiores no. Solamente existirán células superiores en una posición en el momento que se supere la cantidad de células inferiores. El número máximo de células en una posición de la red es M . Desde la primera hasta m ($m \leq M$) se las etiqueta como células inferiores, y tienen acceso a los nutrientes (cuando están presentes); y las células restantes (desde $M - m$ hasta M como máximo) que aparecen en esa posición se consideran células superiores, y no tienen acceso a los nutrientes. Las células que tienen acceso a los nutrientes se las denomina activas, lo que significa que son capaces de reproducirse y conjugarse, las células que carecen de acceso a los nutrientes se las designa como inactivas y no pueden reproducirse, ni conjugarse.

Es un modelo de interacción de partículas (IPS) o un autómata celular estocástico. Debido al hecho de que las posiciones de la malla se actualizan estadísticamente, y que compendian la información 3D de la colonia, el modelo puede ser como un “coupled map lattice” o CML estocástico.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Las simulaciones del modelo se realizan sobre una malla de 2000x2000 con fronteras periódicas, esto quiere decir, que el borde superior de la red es igual al borde inferior y el borde izquierdo al borde derecho, así logran quitarse la complicación de los efectos que producen los bordes. Cada sitio de la red puede contener varios tipos de células: donantes (D), receptoras (R) y transconjugantes (T). Además de estos tipos, cada célula a su vez va a ser inferior o superior y no cambia en simulaciones con transferencia del filtro sin perturbaciones, pero que puede cambiar en simulaciones con transferencia del filtro con perturbaciones.

La vecindad local, especifica las posiciones de la malla, en donde se puede producir la conjugación y se pueden colocar las células hijas tras la división celular. La vecindad local de una posición determinada x son las nueve posiciones en un cuadro 3x3 con centro en x . En cada paso de la simulación, es elegida una posición al azar; y gracias a la comparación de las tasas de los distintos eventos, se determina si un cambio debe ser realizado en esta posición (o en una vecina), y si es así, ¿cuál sería ese cambio?.

La escala de tiempo de las simulaciones lo establecieron, considerando que el tiempo real de duplicación de las células receptoras es de 80 minutos.

Las tasas de reproducción y conjugación dependen sólo de los niveles de nutrientes de una manera indirecta a través de los parámetros m y L . Puede ser más o menos una idea de como se representa la difusión del nutriente y la cantidad de nutrientes diarios, respectivamente. Se especifican tasas de crecimiento constantes Ψ_R , Ψ_D y Ψ_T para R , D y T , respectivamente, y una tasa de conjugación γ . Estas tasas se supone que tendrán efecto cuando las células se “activan”, en otro caso las tasas son 0. Cuando una célula es elegida para reproducirse, las hijas se colocan en la misma posición que la “madre” con una probabilidad de $1 - p_g$; y en una de las otras ocho sitios vecinos con probabilidad p_g (a este tipo de probabilidad se la conoce como parámetro de acoplamiento en los CML). Del mismo modo, $1 - p_c$ es la probabilidad de que la conjugación de un plásmido entre dos células se produzca en el mismo sitio. La pérdida del plásmido conjugativo ocurre con probabilidad τ . Esto ocurre cuando una hija de una célula con plásmido conjugativo (D o T) no puede heredar el plásmido conjugativo durante la división celular. Entonces, cuando una célula transconjugante se divide, la célula hija será T con una probabilidad $1 - \tau$ (resultado de la transferencia vertical del plásmido) y R con una probabilidad τ . Así, n_R^w es el número de células R que se encuentran en la posición central (w indica “within”) y n_R^{nbr} es el número total de células R que se encuentran en

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

las ocho posiciones de la vecindad (nbr indica “neighbour”), los mismo para las células D y T . El número de células activas en cada categoría se representa con el subíndice “act”; por ejemplo, $n_{R,act}^{nbr}$ indica el número total de células R con acceso a nutrientes en las ocho posiciones de la vecindad. Además, $n_V^w = M - n_R^w - n_D^w - n_T^w$ muestra la cantidad de espacio que queda en la posición central y $n_V^{nbr} = 8M - n_R^{nbr} - n_D^{nbr} - n_T^{nbr}$ la cantidad de espacio que queda en las ocho posiciones de la vecindad. Si dividimos las cantidades de la posición central por M , se obtiene la fracción de la posición central y se representa de la siguiente manera: $f_{\bullet}^w = n_{\bullet}^w/M$, donde \bullet puede representar cualquier subíndice. Del mismo modo, la división de las cantidades de las posiciones vecinas por $8M$, generando las siguientes fracciones: $f_{\bullet}^{nbr} = n_{\bullet}^{nbr}/8M$. La tasa con la que una posición central produce una nueva célula R es

$$(\Psi_R n_{R,act}^w + \tau \Psi_T n_{T,act}^w + \tau \Psi_D n_{D,act}^w)((1 - p_g)f_V^w + p_g f_V^{nbr})$$

una nueva D es

$$(1 - \tau)\Psi_D n_{D,act}^w((1 - p_g)f_V^w + p_g f_V^{nbr})$$

y una nueva T es

$$(1 - \tau)\Psi_T n_{T,act}^w((1 - p_g)f_V^w + p_g f_V^{nbr}) + \gamma(n_{T,act}^w + n_{D,act}^w)((1 - p_c)f_{R,act}^w + p_c f_{R,act}^{nbr})$$

En la última expresión, los términos involucrados con γ corresponden a la conjugación. La posición seleccionada para efectuar la conjugación, sufrirá un aumento del número de células transconjugantes y un decremento de células receptoras. En el caso de la reproducción, cuando un descendiente se coloca en una de las posiciones de vecindad, la posición es escogida de manera aleatoria de entre las ocho, con una probabilidad proporcional a la fracción del espacio vacío en el sitio o $p_g f_V^{nbr}$. En todos los casos, la nueva célula se sitúa en el nivel inferior. Se debe de tener en cuenta que, una posición que está completa por M células no puede tener descendencia. La tasa per cápita de crecimiento para las células receptoras, $\Psi_R((1 - p_g)f_V^w + p_g f_V^{nbr})$, se expresa de una manera que depende del número de huecos (y por tanto de la densidad de células) en la posición central y en sus vecinas. Esto mismo sucede para las células transconjugantes y donadoras. Los parámetros del modelo se pueden observar en la siguiente tabla 2.3.

Por último, para no complicar el modelo, se omitieron todas aquellas células que surgen a partir de las donadoras y sufren la pérdida del plásmido conjugativo.

En las simulaciones con transferencia del filtro sin perturbaciones, simplemente lo que se hizo fue reiniciar el reloj de nutrientes a 0 al comienzo de cada paso (así hay Lh

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

| Parámetros | Definición | Valor | Unidades |
|-----------------|---|-------|---------------------|
| M | Número máximo de células por sitio | 40 | Células |
| R_0 | Número inicial de células receptoras por sitio | 4 | Células |
| D_0 | Número inicial de células donadoras por sitio | 5 | Células |
| d_R | Tiempo de duplicación de una célula receptora | 80 | minutos |
| Ψ_T/Ψ_R | Tasa de crecimiento relativo de transconjugantes por receptoras | 0.95 | |
| Ψ_D/Ψ_R | Tasa de crecimiento relativo de donadoras por receptoras | 0.76 | |
| m | Número de células activas por sitio | 16 | Células |
| L | Periodo de tiempo con nutrientes accesibles | 9 | horas |
| γ | Tasa de conjugación | 2 | horas ⁻¹ |
| p_g | Parámetro de acoplamiento para el crecimiento | 0.5 | |
| p_c | Parámetro de acoplamiento para la conjugación | 0.9 | |

Tabla 2.3: Parámetros del modelo.

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

nutrientes accesibles para las células en la zona activa), dejando la estructura espacial y los estados de las células igual. En las simulaciones con transferencia del filtro con perturbaciones, cada paso se comienza distribuyendo de manera aleatoria las células entre las posiciones con un máximo de M por sitio, y luego se determina aleatoriamente las células que deben ir en la zona activa; después de llenar las zonas activas las células restantes se colocan en las zonas inactivas.

Estos modelos, a diferencia de los modelos basados en la ley de acción de masas que se basan en las concentraciones en un medio líquido y densidades que pueden especificarse en términos de unidades, en los IPS se entiende que las tasas simplemente significan el tiempo hasta que un determinado acontecimiento ocurre.

Cada posición es la ubicación de un microcluster de hasta M células y mide en torno a 1 o 2 μm . Las distancias intercelulares también son del orden de micrómetros, si cada malla tiene 2000 posiciones por lado, debemos considerar que la ventana de simulación es de varios milímetros por lado.

2.3.5. Modelo con ecuaciones diferenciales ordinarias o ODE

Los modelos con ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), sirven para modelizar a las bacterias sobre medios líquidos, cuya mezcla sea homogénea, en donde las bacterias chocan de manera azarosa e inician el proceso de transferencia del plásmido, con tasas de conjugación media que ignoran los efectos de ciertas características de la dinámica.

Consideremos a modo de ejemplo dos especies químicas que reaccionan molécula a molécula según un esquema determinado, por ejemplo, $A + 2B \xrightarrow{k_1} 2A$ con cierta constante de reacción k_1 . Si la reacción depende del contacto y se agita bien la mezcla para que la distribución tienda a ser homogénea, las moléculas colisionarán en función de sus densidades y las tasas de cambio dependerán de éstas según la llamada *ley de acción de masas*. En un modelo con ecuaciones diferenciales ordinarias, las tasas son proporcionales a la constante de reacción y al producto de las densidades de las especies que intervienen. Por tanto, la probabilidad de colisión —p.ej. tasa de disminución de B en la reacción anterior—, será $k_1 \cdot A \cdot B^2$. Un equivalente en ecología son los modelos de los años 1920 para un depredador y una presa o dos especies en competencia de Alfred J. Lotka y Vito Volterra.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

El documento “*Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics*” [9] que se explica posteriormente, supone un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias para la conjugación.

La conjugación requiere de una acción prolongada de contacto entre las bacterias donadoras y las receptoras. Algunas estimaciones [48], [49] afirman que la conjugación puede tardar entre 3 y 5 minutos para algún tipo de plásmidos. En poblaciones como los biofilms, el contacto necesario para realizar la conjugación está localizado y tiende a ser bastante estable, por la ausencia de fuerzas externas. Sin embargo, en un medio líquido con la disolución bien mezclada, la conjugación no sólo sucede de manera casual. Las células en entornos líquidos forman los llamados “mating aggregates” o grupos de apareamiento (conjuntos de bacterias mixtas, formados por células con y sin plásmido conjugativo). Están unidos por las fimbrias, además de los pili(en las especies gram-negativas; [50]) y adhesina (feromona producida a menudo por especies Gram-positiva; [51]; [52]). Las grupos de apareamiento pueden constar de dos (parejas de apareamiento) o más células (por ejemplo, con alrededor de 20 células de tipo *E. coli* formadas por pilus producidos por el plásmido F, y de varios cientos de células tipo *Enterococcus faecalis* unidas por feromonas). Las fuerzas existentes en los medios líquidos pueden romper estos conjuntos.

La conjugación en medios líquidos consta de 4 pasos:

1. Choque o colisión.
2. Acoplamiento.
3. Transferencia del plásmido.
4. Desacoplamiento.

Un ejemplo de modelo con ecuaciones diferenciales ordinarias obtenidas a partir de la ley de acción de masas es el siguiente 2.2 [53], [54]:

$$\begin{cases} \dot{R} = \psi_R(C)R - \gamma_T^{bruta}RT - \gamma_D^{bruta}RD \\ \dot{T} = \psi_T(C)T + \gamma_T^{bruta}RT + \gamma_D^{bruta}RD \\ \dot{D} = \psi_D(C)D \\ \dot{C} = -e(\psi_R(C)R + \psi_T(C)T + \psi_D(C)D) \end{cases} \quad (2.2)$$

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

donde (R) es la densidad de receptoras, (D) es la densidad de donadoras, (T) es la densidad de transconjugantes y (C) la densidad de nutrientes, ψ es la tasa de crecimiento y γ^{bruta} la tasa de conjugación bruta, donde cada subíndice indica de que tipo es. El parámetro e , indica la cantidad de nutrientes necesarios para generar una nueva bacteria.

En este ejemplo se consideran las tasas de crecimiento y de conjugación bruta. Asumiendo factores, como la intensidad de la mezcla, que puede afectar a la dinámica en la transferencia del plásmido [9], o las tasas de acoplamiento y desacoplamiento, que varían en función del tipo de plásmido, el cual define la longitud y flexibilidad del pilus [55].

Experimentalmente las tasas de conjugación bruta del modelo anterior γ^{bruta} , son del orden de 10^{-5} a 10^{-8} [56], [54] sin embargo la tasa de conjugación intrínseca γ^0 que se refiere al proceso de transferencia de ADN de una célula a otra [48], [49], es del orden de 1 a 10 en modelos espacialmente explícitos (véase el apartado 2.3.4). Esta diferencia no es sorprendente. La tasa de conjugación bruta de una bacteria donadora en modelos EDO, significa la difusión que existe sobre todas las células receptoras dentro de un determinado volumen —p.ej. 10^8 bacterias/ml—; en un EDO todas las bacterias receptoras se consideran equivalentes, mientras que en un modelo espacial las únicas receptoras son las vecinas de una determinada bacteria donadora. La tasa de conjugación bruta es mucho menor que la tasa de conjugación intrínseca, ya que se debe presuponer el tiempo de colisión, de acoplamiento y desacoplamiento.

En el siguiente modelo [9], separa la tasa de conjugación bruta en tres tasas, la tasa de acoplamiento, desacoplamiento, y la de transferencia de ADN. Este simple hecho, permite experimentalmente tener en cuenta subprocesos que con un modelo estándar no.

Se desarrollo un EDO capaz de modelizar parejas de apareamiento conjugativo, sobre una disolución homogénea de bacterias. Además de la concentración de nutrientes C y de las densidades de bacterias R , T , D , se añaden densidades de las parejas. Cuando una bacteria está acoplada con otra, se utiliza el siguiente símbolo “::”. Por ejemplo, cuando una bacteria R colisiona y se acopla con otra T , con una tasa k^+RT formando una pareja, se representa como $R :: T$. Las parejas $R :: D$ se forman con una tasa k^+RD . Se tendrán en cuenta, sólo aquellas parejas que lleven a cabo operaciones conjugativas. Así, las parejas $T :: T$ y $T :: D$, se considerarán en los casos que haya habido

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

conjugación, y se desecharán las parejas $R :: R$ y $D :: D$. La tasa de desacoplamiento es k_- y se asume que es la misma para cualquier pareja. Entonces, una pareja $T :: R$ se desacopla, con una tasa k_- , dando lugar a dos bacterias individuales R y T .

Las densidades que corresponden a las parejas $T :: R$, $D :: R$, $T :: T$, $D :: T$, se denotan como, M_{TR} , M_{DR} , M_{TT} y M_{DT} respectivamente. Para la simplificación del modelo, no se consideran más de 2 células por grupo de apareamiento, ya que sino, aumentaría considerablemente el número de ecuaciones y de estados.

El crecimiento de las células es independiente de si las células están acopladas o no [50]. Como no se pueden tener grupos de apareamiento con un número mayor a 2, se asume que cuando una célula se reproduce en una pareja, la célula hija pasa a ser una célula individual del mismo tipo.

Las tasas de conjugación intrínseca de D y T , dentro de una pareja de apareamiento, se denotan como, γ_D^0 y γ_T^0 , respectivamente, estas dependen de la concentración de nutrientes C . Estas tasas intrínsecas, se pueden ver como algo parecido, a las tasas de conjugación entre vecinos de los modelos IPS, véase el apartado 2.3.4. Las tasas de crecimiento se conocen como ψ_R , ψ_D y ψ_T , para R , D , T , respectivamente, dependiendo todas ellas de la concentración de nutrientes C . Finalmente, e indica la cantidad de nutrientes necesarios para generar una nueva bacteria.

El sistema de ecuaciones es el siguiente 2.3.

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{R} = \psi_R(C)(R + M_{TR} + M_{DR}) + k_-(M_{TR} + M_{DR}) - k_+R(T + D) \\ \dot{T} = \psi_T(C)(T + M_{TR} + M_{DT} + 2M_{TT}) + k_-(M_{TR} + M_{DT} + 2M_{TT}) - k_+RT \\ \dot{D} = \psi_D(C)(D + M_{DR} + M_{DT}) + k_-(M_{DR} + M_{DT}) - k_+RD \\ \dot{M}_{TR} = k_+RT - k_-M_{TR} - \gamma_T^0(C)M_{TR} \\ \dot{M}_{DR} = k_+RD - k_-M_{DR} - \gamma_D^0(C)M_{DR} \\ \dot{M}_{TT} = \gamma_T^0(C)M_{TR} - k_-M_{TT} \\ \dot{M}_{DT} = \gamma_D^0(C)M_{DR} - k_-M_{DT} \\ \dot{C} = -e[\psi_R(C)(R + M_{TR} + M_{DR}) + \psi_T(C)(T + M_{TR} + M_{DT} + 2M_{TT}) + \psi_D(C)(D + M_{DR} + M_{DT})] \end{array} \right. \quad (2.3)$$

Las unidades de R , D , T , M_{TR} , M_{DR} , M_{TT} y M_{DT} son bacterias/ml y de C $\mu\text{g/ml}$.

2.3 Modelos para simular un sistema bacteriano

El modelo no considera la tasa de mortalidad, ni la tasa de pérdida del plásmido (en experimentos temporalmente cortos resultan insignificantes).

La tabla 2.4 nos muestra un resumen de los parámetros usados y sus unidades. El parámetro k_+ es el parámetro que más se asemeja a la tasa de conjugación bruta. Se mostró experimentalmente que la magnitud observada para la tasa de conjugación bruta, viene en gran medida dada por la tasa de acoplamiento, mientras que los otros parámetros (transferencia de ADN y desacoplamiento) juegan un papel menor. La velocidad con la que se mezcla la disolución, el tipo de células y sus plásmidos, son factores que influyen en las tasas k_- y k_+ . Intuitivamente, se puede decir, que si se mezcla la disolución con más velocidad, las fuerzas de ruptura de los pares serán mayores, por lo que k_- será mayor. Pero sin embargo, si por el contrario, se mezcla la disolución de una manera suave, las parejas de apareamiento se mantendrán inalterables [50], con una tasa de desacoplamiento casi igual a cero. El efecto sobre k_+ es menos obvio. La tasa de acoplamiento, a bajas velocidades es baja, y a medida que se va aumentando la velocidad aumentan las colisiones, por lo que aumenta con rapidez; pero hay un momento en el que aunque aumente la velocidad de mezcla, la tasa de acoplamiento no aumenta, ya que la proporción de tiempo durante el cual dos células se encuentran en un pequeño volumen converge a un equilibrio. Debido al movimiento molecular en los líquidos, k_+ será positiva incluso en un líquido estático. La figura 2.24 muestra las curvas de las tasas de acoplamiento y desacoplamiento.

| Parámetros | Definición | Unidades |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| ψ_T, ψ_D, ψ_R | Tasas de crecimiento | h^{-1} |
| γ_D^0, γ_T^0 | Tasas de conjugación intrínseca | h^{-1} |
| k_+ | Tasa de acoplamiento | $mlbacterias^{-1}h^{-1}$ |
| k_- | Tasa de desacoplamiento | h^{-1} |

Tabla 2.4: Resumen de los parámetros usados en el EDO.

2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

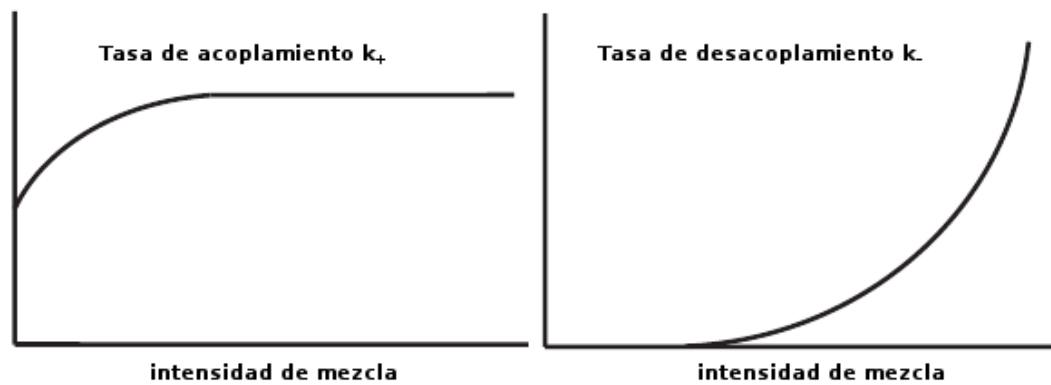


Figura 2.24: Interpretación en gráficas de las tasas, k_- y k_+ : - Curvas explicativas, de la tasa de acoplamiento k_+ y de desacoplamiento k_- . Obtenido con permiso del trabajo de: [9] Xue Zhong et al. "Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics", Journal of Theoretical Biology, y año 2010.

3

Conclusiones y futuras lineas de investigación

3.1. Conclusión y futuras lineas de investigación

El siglo XX fué un siglo marcado por la física. Creo, que el siglo XXI va a ser el siglo de la biología, del querer comprender como se comporta la naturaleza. Digo esto, porque cada vez existen más trabajos de biología multidisciplinarios, que requieren de la ayuda de distintos especialistas. Explicar los comportamientos de la naturaleza, ya no son solo trabajo de los biólogos. Sino que pueden estar involucrados matemáticos, físicos, ingenieros, médicos y químicos.

Se ha observado, que al contrario de lo que se pensaba, los microorganismos son capaces de realizar tareas de manera conjunta. Las bacterias no son individuos solitarios y aislados, que solo comen y se reproducen. Se ha visto que pueden comunicarse. Bien dejando señales químicas en el medio o bien porque transfieren material genético a otras bacterias. Las bacterias, gracias a estos protocolos de comunicación, pueden resolver problemas que ellas solas serían incapaces, por ejemplo, la invasión de otro organismo, la búsqueda de nutrientes, la resistencia a antibióticos, etc. Lo que hace la biología sintética con estos nuevos descubrimientos, es usarlos de manera artificial. Mientras, que la biología de sistemas, por el contrario, se apoya en estos nuevos conocimientos, para intentar explicar comportamientos naturales que antes no podía.

Modelizar matemáticamente y poder simular estos sistemas biológicos, se hace necesario porque la simple experimentación muchas veces es escasas para poder compren-

3. CONCLUSIONES Y FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

der los mecanismos que utiliza la naturaleza. Los experimentos, como se ha visto, son complejos, lentos y costosos. Los modelos permiten evaluar principios, que luego la experiencia dirá si son válidos o no.

Conseguida una comprensión de los protocolos de comunicación. El próximo paso, es diseñar, simular, y obtener resultados, de un sistema bacteriano que se valga de la conjugación, para difundir una señal. También es interesante seguir investigando en las distintas formas de comunicación que tiene las bacterias y sus modelización matemática. Otra línea de investigación que se puede tomar, es el diseño y modelización de nuevos dispositivos o circuitos genéticos a nivel de población. Por ejemplo, el entendimiento de los protocolos de comunicación entre bacterias, permitirá el desarrollo de nuevos antibióticos, programar colonias de bacterias para que fabriquen de manera eficiente y colaborativa biocombustibles, fármacos, etc. Computacionalmente, los sistemas bacterianos, son muy útiles, al permitir la resolución de problemas NP-complejos. Se ha observado que las colonias de bacterias, tienen comportamientos cooperativos, en los que el individuo es parte de un resultado global emergente descentralizado, también son sistemas auto-organizados; estos temas son de alto interés en el campo de la inteligencia artificial, con lo que deben de ser tenidos en cuenta para futuras investigaciones.

Glosario

A

- ADN recombinante** Molécula de ADN artificial formada de manera deliberada in vitro, pág. 2.
- agar** Sustancia gelatinosa derivada de algas marinas, que sirve como medio de cultivo, pág. 13.

B

- bacterias recombinantes** Bacterias en las que se han introducido genes no bacterianos, pág. 14.
- bacteriocina** Toxina proteica sintetizada por una bacteria con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas, pág. 10.
- bacteriófago** Virus que infectan exclusivamente a bacterias, pág. 2.
- biobrick** Cadena de ADN con una estructura y una función definida, pág. 36.
- biofilm** O biopelícula, es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas, pág. 7.
- bioluminiscencia** Producción de luz de ciertos organismos vivos, pág. 22.

- biosensor** Instrumento para la medición de parámetros biológicos o químicos. Suele combinar un componente de naturaleza biológica y otro físico-químico, pág. 36.

C

- cascadas bioquímicas** Una serie de reacciones químicas en las que los productos de una reacción son consumidos en la siguiente reacción, pág. 23.
- catabolizar** Proceso de transformación de biomoléculas complejas en moléculas sencillas para el almacenamiento de la energía, pág. 11.
- células diploides** Son aquellas células que tienen un número doble de cromosomas, es decir, poseen dos series de cromosomas, pág. 63.
- células endoteliales** Son un tipo de células aplanadas que recubren el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared, pág. 25.
- células haploides** Son aquellas células que contienen un solo juego de cromosomas o la mitad del número normal de cromosomas en células diploides, pág. 14.
- cigoto** Célula resultante de la unión del gameto masculino con el femenino en la reproducción sexual de los organismos, pág. 14.
- cloramfenicol** Antibiótico que impide la reproducción en algunas bacterias, pág. 10.
- competencia genética** Es un estado fisiológico en el que las bacterias son capaces de incluir moléculas de ADN exógeno, pág. 22.
- cotiledones** Las hojas primordiales constitutivas de la semilla y se encuentran en el germen o embrión, pág. 64.

GLOSARIO

D

- detoxificar** Desbloqueo de las funciones que impiden el normal funcionamiento del organismo, pág. 20.
- dicotiledóneas** Plantas que tienen, durante las primeras etapas de desarrollo, dos cotiledones, pág. 11.

E

- endocitosis** Proceso celular, por el que la célula introduce moléculas grandes o partículas, y lo hace formando vesículas que terminan por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma, pág. 64.
- endosoma** Un orgánulo con membrana encargada de transportar el material procedente del exterior que ha sido captado mediante endocitosis, pág. 25.
- episomas** Material genético que puede integrarse en el cromosoma, pág. 8.
- escherichia coli** Quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas fecales, pág. 2.
- estreptomycin** Antibiótico que impide la multiplicación celular, pág. 14.
- eucariotas** Células con núcleo celular diferenciado, pág. 8.

F

- feromonas** Son sustancias químicas secretadas por una especie con el fin de provocar un comportamiento determinado en otro individuo de la misma u otra especie, pág. 20.

fimbrias

Apéndices proteínicos presentes en muchas bacterias, más delgados y cortos que los flagelos, pág. 56.

fructíferos

Estructura multicelular sobre la que se forman otras estructuras productoras de esporas, pág. 22.

G

gram-negativas Bacterias en las que la envoltura está compuesta por, dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, pág. 22.

gram-positivas Bacterias en las que la envoltura está compuesta por, una sola membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa que en las gram-negativas, pág. 23.

H

hormonas Son sustancias segregadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna, pág. 20.

M

metabolitos Cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo, pág. 13.

metabolizar Proceso por el cual el organismo consigue que algunas sustancias dejen de ser activas para convertirse en no activas, pág. 20.

N

nucleótidos Son los monómeros de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) en los cuales forman cadenas lineales de miles o millones de nucleótidos, pero también realizan funciones

importantes como moléculas libres (por ejemplo, el ATP), pág. 65.

O

orgánulo Diferentes estructuras suspendidas en el citoplasma de la célula eucariota, pág. 64.

P

pares de bases Son dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno, pág. 65.

pares ortogonales Son pares de bases que no se encuentran de manera natural, son sintéticas, pág. 28.

patógeno Entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un huésped (humano, animal, vegetal, etc.) sensiblemente predispuesto, pág. 23.

pilin Una clase de proteínas fibrosas que se encuentran en las estructuras del pilus en las bacterias, pág. 19.

pilus Son estructuras en forma de pelo, más cortas y finas que los flagelos. Se encuentran en la superficie de muchas bacterias. Su plural es pili, pág. 65.

procariontes Células sin núcleo celular diferenciado, pág. 7.

proteobacterias Son uno de los principales grupos de bacterias. Son gram-negativas, pág. 23.

R

recombinación genética Proceso por el cual una hebra de material genético (usualmente ADN; pero también puede ser ARN) es rota y luego unida a una molécula de material genético diferente, pág. 65.

recombinación homóloga También conocida como recombinación general. Es un tipo de recombinación genética en la cual las secuencias de nucleótidos son intercambiadas entre dos cadenas similares o idénticas de ADN, pág. 19.

red de regulación génica Colección de segmentos de ADN que regulan las tasas a las que los genes se transcriben en ARNm, pág. 2.

ribosomas Son complejos supramoleculares encargados de sintetizar proteínas a partir de la información genética que les llega del ADN transcrita en forma de ARN mensajero (ARNm), pág. 28.

S

simbiontes Organismos que conviven en simbiosis, pág. 22.

simbiosis Relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies, pág. 65.

sintasas Enzima catalizadora de moléculas, pág. 23.

T

transducción de la señal Conjunto de procesos o etapas que ocurren de forma concatenada por el que una célula convierte una determinada señal o estímulo exterior, en otra señal o respuesta específica, pág. 23.

transferencia del filtro con perturbaciones

Cambio de la población a un medio fresco con alteración de la estructura espacial, pág. 52.

transferencia del filtro sin perturbaciones

Cambio de la población a un medio fresco sin alteración de la estructura espacial, pág. 52.

GLOSARIO

Z

zigosis letal Desorganización de la pared bacteriana producida por los excesivos

contactos donador-receptor. Puede provocar la muerte de la bacteria, pág. 37.

Bibliografía

- [1] LM ADLEMAN. **Molecular computation of solutions to combinatorial problems.** *Science*, **266**(5187):1021–1024, November 1994. 2
- [2] MICHAEL B. ELOWITZ AND STANISLAS LEIBLER. **A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators.** *Nature*, **403**(6767):335–338, January 2000. 2
- [3] LEON Y CHAN, SRIRAM KOSURI, AND DREW ENDY. **Refactoring bacteriophage T7.** *Mol Syst Biol*, **1**:1–10, 2005. 2
- [4] JORDI GARCIA-OJALVO, MICHAEL B. ELOWITZ, AND STEVEN H. STROGATZ. **Modeling a synthetic multicellular clock: Repressilators coupled by quorum sensing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(30):10955–10960, 2004. 3
- [5] BENJAMIN KERR, MARGARET A. RILEY, MARCUS W. FELDMAN, AND BRENDAN J. M. BOHANNAN. **Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors.** *Nature*, **418**(6894):171–174, July 2002. 3, 45
- [6] CRISTINA LAGIDO, IAN J WILSON, L. ANNE GLOVER, AND JIM I PROSSER. **A model for bacterial conjugal gene transfer on solid surfaces.** *FEMS Microbiology Ecology*, **44**(1):67–78, 2003. 5, 40, 42, 45
- [7] STEPHEN M. KRONE, RUINAN LU, RANDAL FOX, HARUO SUZUKI, AND EVA M. TOP. **Modelling the spatial dynamics of plasmid transfer and persistence.** *Microbiology*, **153**(8):2803–2816, August 2007. 5, 46, 47
- [8] RANDAL E FOX, XUE ZHONG, STEPHEN M KRONE, AND EVA M TOP. **Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations.** *ISME J*, **2**(10):1024–1039, June 2008. 5, 51
- [9] XUE ZHONG, KRÓL JAROSLAW E., EVA M. TOP, AND STEPHEN M. KRONE. **Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics.** *Journal of Theoretical Biology*, **262**(4):711–719, February 2010. 5, 56, 57, 60
- [10] LONG CAI, CHIRAJ K. DALAL, AND MICHAEL B. ELOWITZ. **Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation.** *Nature*, **455**(7212):485–490, september 2008. 8
- [11] SUNAO TAKESHITA, MASAHIRO SATO, MARI TOBA, WAKAKO MASAHASHI, AND TAMOTSU HASHIMOTO-GOTOH. **High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for lacZ[alpha]-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection.** *Gene*, **61**(1):63 – 74, 1987. 10
- [12] MATXALEN LLOSA AND FERNANDO DE LA CRUZ. **Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering.** *Research in Microbiology*, **156**(1):1–6, January 2005. 18
- [13] SCOTT A. LUJAN, LAURA M. GUOGAS, HEATHER RAGONESE, STEVEN W. MATSON, AND MATTHEW R. REDINBO. **Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(30):12282–12287, 2007. 19
- [14] BONNIE L. BASSLER AND RICHARD LOSICK. **Bacterially Speaking.** *Cell*, **125**(2):237–246, April 2006. 22
- [15] ANNE MCVITTIE, FRANCES MESSIK, AND STANLEY A. ZAHLER. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF MYXOCOC-CUS.** *J. Bacteriol.*, **84**(3):546–551, 1962. 22
- [16] ALEXANDER TOMASZ. **Control of the Competent State in Pneumococcus by a Hormone-Like Cell Product: An Example for a New Type of Regulatory Mechanism in Bacteria.** *Nature*, **208**(5006):155–159, October 1965. 22
- [17] K H NEALSON, T PLATT, AND J W HASTINGS. **Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system.** *Journal of Bacteriology*, **104**(1):313–322, October 1970. PMID: 5473898. 22
- [18] A. EBERHARD, A. L. BURLINGAME, C. EBERHARD, G. L. KENYON, K. H. NEALSON, AND N. J. OPPENHEIMER. **Structural identification of autoinducer of Photobacterium fischeri luciferase.** *Biochemistry*, **20**(9):2444–2449, 1981. 22
- [19] W C FUQUA, S C WINANS, AND E P GREENBERG. **Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators.** *Journal of Bacteriology*, **176**(2):269–275, January 1994. PMID: 8288518 PMID: 205046. 23
- [20] MICHIEL KLEEREBEZEM, LUIS E. N. QUADRI, OSCAR P. KUIPERS, AND WILLEM M. DE VOS. **Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria.** *Molecular Microbiology*, **24**(5):895–904, 1997. 23
- [21] BETH A. LAZAZZERA AND ALAN D. GROSSMAN. **The ins and outs of peptide signaling.** *Trends in Microbiology*, **6**(7):288 – 294, 1998. 23
- [22] SAARA N. A. QAZI, EMILIE COUNIL, JULIE MORRISSEY, CATHERINE E. D. REES, ALAN COCKAYNE, KLAUS WINZER, WENG C. CHAN, PAUL WILLIAMS, AND PHILIP J. HILL. **agr Expression Precedes Escape of Internalized Staphylococcus aureus from the Host Endosome.** *Infect. Immun.*, **69**(11):7074–7082, November 2001. 25
- [23] ROSEMARY J. REDFIELD. **Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?** *Trends in Microbiology*, **10**(8):365–370, August 2002. 25
- [24] KLAUS WINZER, KIM R. HARDIE, AND PAUL WILLIAMS. **Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can’t talk now – gone to lunch!** *Current Opinion in Microbiology*, **5**(2):216–222, April 2002. 25
- [25] HELEN WITHERS, SIMON SWIFT, AND PAUL WILLIAMS. **Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria.** *Current Opinion in Microbiology*, **4**(2):186–193, April 2001. 25

BIBLIOGRAFÍA

- [26] FARREN J ISAACS, DANIEL J DWYER, CHUNMING DING, DMITRI D PERVOUCHINE, CHARLES R CANTOR, AND JAMES J COLLINS. **Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression.** *Nat Biotech*, **22**(7):841–847, July 2004. 28, 29
- [27] K A DATSENKO AND B L WANNER. **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(12):6640–6645, June 2000. PMID: 10829079. 29
- [28] F WU, I LEVCHENKO, AND M FILUTOWICZ. **Binding of DnaA protein to a replication enhancer counteracts the inhibition of plasmid R6K gamma origin replication mediated by elevated levels of R6K pi protein.** *J. Bacteriol.*, **176**(22):6795–6801, November 1994. 31
- [29] G S BEZANSON AND V N IYER. **dnaB gene of Escherichia coli K-12 affects superinfection inhibition between F' plasmids.** *J. Bacteriol.*, **123**(1):137–146, July 1975. 31
- [30] M. PILAR GARCILLÁN-BARCIA AND FERNANDO DE LA CRUZ. **Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids?** *Plasmid*, **60**(1):1–18, July 2008. 36
- [31] GREGORY PHILLIPS AND BARBARA E. FUNNELL. *Plasmid biology*. ASM Press, June 2004. 36
- [32] J HAASE, R LURZ, AM GRAHN, DH BAMFORD, AND E LANKA. **Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex.** *J. Bacteriol.*, **177**(16):4779–4791, August 1995. 37
- [33] PEI-LI LI, INGYU HWANG, HEATHER MIYAGI, HEATHER TRUE, AND STEPHEN K. FARRAND. **Essential Components of the Ti Plasmid trb System, a Type IV Macromolecular Transporter.** *J. Bacteriol.*, **181**(16):5033–5041, August 1999. 37
- [34] JONATHAN T. OU. **Role of surface exclusion genes in lethal zygosis in Escherichia coli K12 mating.** *MGG Molecular & General Genetics*, **178**(3):573–581, July 1980. 37
- [35] M.A. ZAVALA, R. DÍAZ-SIERRA, D. PURVES, G.E. ZEA, AND I.R. URBETA. **Modelos espacialmente explícitos.** *AEET*, **15**(3):88–99, September 2006. 39, 43
- [36] HENRY CLAVERING TUCKWELL. *Elementary applications of probability theory: with an introduction to stochastic differential equations*. Chapman & Hall, 1995. 42
- [37] R. DURRETT. **Stochastic spatial models.** *Mathematics Inspired by Biology*, page 39–94, 1999. 45
- [38] ULF DIECKMANN, RICHARD LAW, JOHAN A. J. METZ, AND INTERNATIONAL INSTITUTE FOR APPLIED SYSTEMS ANALYSIS. *The geometry of ecological interactions: simplifying spatial complexity*. Cambridge University Press, 2000. 45
- [39] CRISTIAN PICIOREANU, JAN-ULRICH KREFT, AND MARK C. M. VAN LOOSDRECHT. **Particle-Based Multidimensional Multispecies Biofilm Model.** *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(5):3024–3040, May 2004. 45
- [40] JOAO B. XAVIER, CRISTIAN PICIOREANU, AND MARK C. M. VAN LOOSDRECHT. **A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms.** *Environmental Microbiology*, **7**(8):1085–1103, 2005. 45, 50
- [41] STEPHEN M. KRONE AND YONGTAO GUAN. **Spatial self-organization in a cyclic resource-species model.** *Journal of Theoretical Biology*, **241**(1):14–25, July 2006. 45
- [42] ATSUSHI MOCHIZUKI, KOJI YAHARA, ICHIZO KOBAYASHI, AND YOH IWASA. **Genetic Addiction: Selfish Gene's Strategy for Symbiosis in the Genome.** *Genetics*, **172**(2):1309–1323, February 2006. 45
- [43] STEVEN F. RAILSBACK. **Concepts from complex adaptive systems as a framework for individual-based modelling.** *Ecological Modelling*, **139**(1):47–62, March 2001. 46
- [44] VOLKER GRIMM, UTA BERGER, FINN BASTIANSEN, SIGRUNN ELIASSEN, VINCENT GINOT, JARL GISKE, JOHN GOSS-CUSTARD, TAMARA GRAND, SIMONE K. HEINZ, GEIR HUSE, ANDREAS HUTH, JANE U. JEPSEN, CHRISTIAN JØRGENSEN, WOLF M. MOOL, BIRGIT MÜLLER, GUY PE'ER, CYRIL PIOUS, STEVEN F. RAILSBACK, ANDREW M. ROBBINS, MARTHA M. ROBBINS, EVA ROSSMANITH, NADJA RÜGER, ESPEN STRAND, SAMI SOUISSI, RICHARD A. STILLMAN, RUNE VABO, UTE VISSER, AND DONALD L. DEANGELIS. **A standard protocol for describing individual-based and agent-based models.** *Ecological Modelling*, **198**(1-2):115–126, September 2006. 46
- [45] PETER D. LUNDQUIST AND BRUCE R. LEVIN. **Transitory derepression and the maintenance of conjugative plasmids.** *Genetics*, **113**(3):483–497, July 1986. 50
- [46] JASON D. CHAMBLESS, STEPHEN M. HUNT, AND PHILIP S. STEWART. **A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials.** *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(3):2005–2013, March 2006. 50
- [47] T MATSUYAMA AND M MATSUSHITA. **Self-similar colony morphogenesis by gram-negative rods as the experimental model of fractal growth by a cell population.** *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(4):1227–1232, April 1992. 50
- [48] T. D LAWLEY, G. S GORDON, A. WRIGHT, AND D. E TAYLOR. **Bacterial conjugative transfer: visualization of successful mating pairs and plasmid establishment in live Escherichia coli.** *Molecular microbiology*, **44**(4):947–956, 2002. 56, 57
- [49] ANA BABIC, ARIEL B. LINDNER, MARIN VULIC, ERIC J. STEWART, AND MIROSLAV RADMAN. **Direct Visualization of Horizontal Gene Transfer.** *Science*, **319**(5869):1533–1536, March 2008. 56, 57
- [50] M ACHTMAN. **Mating aggregates in Escherichia coli conjugation.** *J. Bacteriol.*, **123**(2):505–515, August 1975. 56, 58, 59
- [51] G M DUNNY, B L BROWN, AND D B CLEWELL. **Induced cell aggregation and mating in Streptococcus faecalis: evidence for a bacterial sex pheromone.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**(7):3479–3483, July 1978. PMID: 98769 PMCID: 392801. 56

BIBLIOGRAFÍA

- [52] S B OLMSTED, S M KAO, L J VAN PUTTE, J C GALLO, AND G M DUNNY. **Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pCF10.** *Journal of Bacteriology*, **173**(23):7665–7672, December 1991. PMID: 1938962 PMCID: 212535. 56
- [53] L. SIMONSEN, D. M. GORDON, F. M. STEWART, AND B. R. LEVIN. **Estimating the rate of plasmid transfer: an endpoint method.** *J Gen Microbiol*, **136**(11):2319–2325, November 1990. 56
- [54] TINE R. LICHT, BJARKE B. CHRISTENSEN, KAREN A. KROGFELT, AND SOREN MOLIN. **Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment.** *Microbiology*, **145**(9):2615–2622, September 1999. 56, 57
- [55] D E BRADLEY, D E TAYLOR, AND D R COHEN. **Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in Escherichia coli K-12.** *Journal of Bacteriology*, **143**(3):1466–1470, September 1980. PMID: 6106013 PMCID: 294536. 57
- [56] DAVID M. GORDON. **Rate of plasmid transfer among Escherichia coli strains isolated from natural populations.** *J Gen Microbiol*, **138**(1):17–21, January 1992. 57